



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTADE DE MEDICINA
INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL

ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DEL CÁNCER COLORRECTAL

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

MARÍA JESÚS LAMAS DÍAZ

Santiago de Compostela, Noviembre de 2010

El Doctor D. Ángel Carracedo Álvarez, Catedrático de Medicina Legal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICA:

Que la presente memoria que lleva por título **“Estudio farmacogenético del cáncer colorrectal”** de la licenciada en Farmacia por la Universidad de Santiago de Compostela María Jesús Lamas Díaz, ha sido realizada bajo mi dirección, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su presentación ante el Tribunal correspondiente:

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, lo firmamos en Santiago de Compostela, a.....de.....de 2010.

Prof. Dr. Ángel Carracedo Álvarez

María Jesús Lamas Díaz

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a:

Beatriz Bernárdez Ferrán

Goretti Durán Piñeiro

Angel Carracedo, por tu maestría, tu ejemplo y tu confianza.

Francisco Barros por tu tutela y trabajo.

Rafael López y Eduardo Echarri, por vuestra confianza y la oportunidad para desarrollar la farmacia oncológica, germen y medio necesario de esta investigación.

Servicio de Oncología Médica (Francisco Barón, Juan Cueva, Sonia Candamio, Francisca Vázquez, Luis León, Teresa Curiel, Begoña Graña, Yolanda Vidal, Jorge García, Elena Gallardo, Urbano Anido, Iago Aguín y Karmele Areses), por compartir vuestro conocimiento y amor a la Medicina, y ofrecerme el entorno y la oportunidad de crecer como persona y profesional clínico.

Antonio Gómez, por tu implicación y empeño en el éxito de buena parte de este proyecto.

Servicio de Oncología Radioterápica, por el reclutamiento de pacientes.

Servicio de Farmacia por vuestra aportación. A los que sois estímulo e inspiración.

Jerónimo Forteza y Catuxa Celeiro, por vuestra disposición y contribución con las muestras tumorales al desarrollo de este estudio.

Pablo Raña, por tu idea original y complicidad para iniciar este proyecto.

Emilia Balboa, por tu aportación y conocimientos en el análisis de las muestras.

Marcos Calvo, soporte y compañero de la travesía oncológica.

Bibiana Sánchez, Roberto García, Carmen Ledo, Carmen Salgueiro, Manuel Tourís y Alicia Mosquera; por vuestra colaboración entusiasta en cualquier proyecto de este equipo.

A los pacientes. Por su generosidad, por mostrarme el sentido de la vida.

A mis padres,
A Javier, Alejandro y Beatriz,

Faro de mi vida

*Para todas las cosas hay sazón,
y todo lo que se quiere debajo del cielo,
tiene su tiempo*

Eclesiastés 3:1.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	17
CÁNCER DE COLON	17
EPIDEMIOLOGÍA	17
ETIOLOGÍA	18
BASES MOLECULARES	22
ANATOMÍA PATOLÓGICA	27
ESTADIAJE	29
DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE EXTENSIÓN	30
TRATAMIENTO	33
CIRUGÍA	33
TRATAMIENTOS NO QUIRÚRGICOS	37
FÁRMACOS Y FARMACOGENÉTICA	50
FARMACOGENÉTICA	50
FÁRMACOS Y SUS BIOMARCADORES FARMACOGENÉTICOS	56
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS	87
CAPÍTULO III: OBJETIVO	91
CAPÍTULO IV: MATERIAL Y MÉTODO	95
CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	107
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	191
ANEXO	195
REFERENCIAS	201

ABREVIATURAS

ABC: Transportador ABC (ATP-binding cassette)

AMI: Arteria mesentérica inferior

APC: Adenomatous Poliposis Coli

APR: Resección abdominoperineal

BAX: Proteína X asociada a Bcl-2

BER: Base Excision Repair (Reparación por escisión de bases)

CpG: Islas de citosina y guanina

CRC: Cáncer colorrectal

DCC: Deleted in Colon Carcinoma

CCHNP: Cáncer de Colon Hereditario -No Polipósico

DPD: Dihidropirimidina Deshidrogenasa

EMA: Agencia europea del medicamento

EORTC: European Organisation for Research and Treatment of Cancer

ERCC 1: Excision Repair Cross Complementation 1

FDA: Food and Drug Administration (Agencia de administración de fármacos y alimentos)

HapMap: International HapMap Consortium 2005

PGx: Farmacogenómica

PGt: Farmacogenética

GSTP1: Glutathión S-transferasa pi 1

GSTM1: Glutathión S-transferasa mu 1

GSTT1: Glutathión S-transferasa theta 1

GDP: Difosfato de guanosina

GTP: Trifosfato de guanosina

GWAS: Genome wide association study

MAPK: Proteína quinasa mitógeno-activada

miARN: MicroARN

MMR: Mismatch Repair System (Sistema de reparacion de bases incorrectamente apareadas)

MS: Metionina sintetasa

MSI: Microsatellite instability (Inestabilidad de microsatelites)

MTHFR: Metilentetrahidrofolato reductasa

NER: Nucleotide excision repair (Reparacion por escision de nucleotidos)

PCR: Reaccion en cadena de la Poimerasa

mPCR: Reacción en cadena de la polimerasa multiple (PCR multiplex)

PI3K: Ruta Fosfatidilinositol 3-kinasa

QT: Quimioterapia

RT: Radioterapia

SAM: S-Adenosilmetionina (donador universal de grupos metilo)

SMA: Arteria mesentérica superior

SSLPs: Simple sequence length polymorphisms

STRs: Short tandem repeats)

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de un solo nucleotido)

TGF-β: factor de crecimiento transformante β

TP: Timidina Fosforilasa

TS/TYMS: Timidilato Sintetasa

UGT: Uridín difosfoglucuronato-glucuronosiltransferasa

VNTR: Variation Number Tandem Repeats (Secuencias repetidas en Tandem de Numero)

VEGF: Vascular Endothelial Grothw Factor

XRCC1: Nucleotide Excision Repair Cross Complementing

CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN

CÁNCER DE COLON

EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer colorrectal (CCR) supone un problema importante de salud pública dada su incidencia y mortalidad. En EEUU resulta ser la tercera causa de muerte por cáncer tras el cáncer de pulmón y próstata en hombres y de mama y pulmón en mujeres. En Europa, supone el segundo tumor con más incidencia después del de mama en mujeres y próstata en hombres, y el segundo en mortalidad tras el del pulmón. Los datos en España del último documento oficial, “La situación del cáncer en España” del 2006, recogen una estimación en el número de casos nuevos por año en torno a los 14.200 en hombres y 11.400 en mujeres, frente a 11.900 defunciones; la tasa ajustada por edad sería 63.58 y 39.01 respectivamente por cada 100.000 personas. La tasa de supervivencia a los 5 años es superior al 50% en ambos sexos.

La mortalidad e incidencia en España son sustancialmente menores que la de los países del norte de Europa (Fig 1), nuestras tasas están por debajo de las tasas promedio de Europa, pero con una mortalidad ya superior a la de Francia, Italia y Reino Unido y una tendencia temporal de incremento¹.

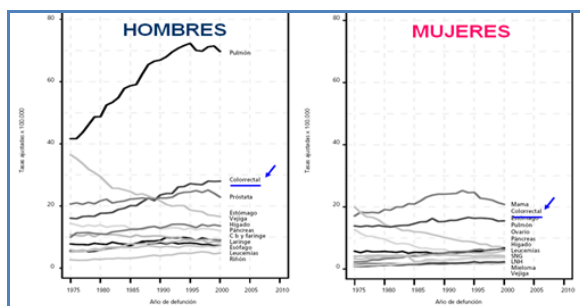


Figura 1: mortalidad por cáncer en Europa (tasa ajustada por años de defunción)

ETIOLOGÍA

La mediana de edad al diagnóstico es de 72 años, un 90% tiene más de 50 años y un 71% más de 65. La longevidad se ha asociado con mayor incidencia de cáncer de colon y es el factor de riesgo de más peso no hereditario.

La incidencia y mortalidad han sido tradicionalmente mayores en países económicamente avanzados. Incluso se ha observado una diferencia en la incidencia en inmigrantes por asimilación a la de la zona receptora. Esto hace pensar en una causalidad basada primordialmente en factores medioambientales. Podría estar relacionado con el consumo de comidas ricas en grasa y carnes rojas y la falta de actividad física con resultado de mayores tasas de obesidad y sobrepeso. Asimismo, las dietas con bajo contenido en fibra y el hábito alcohólico también supondrían mayor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal.

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal implica un riesgo mayor que el de la población general para desarrollar CCR, si bien es más significativo en la colitis ulcerosa que en la Enfermedad de Crohn². El riesgo acumulado en pacientes con pancolitis es aproximadamente del 30% a los 30 años, con una incidencia de 0.5-1% anual. Esto conlleva un riesgo evidente a partir de 10 años de evolución, lo que obliga a un seguimiento intensivo de estos pacientes con fines de detección precoz. En un 10 a 20% aparecen cánceres sincrónicos.

La enfermedad de Crohn implica un mayor riesgo cuando afecta a porciones del colon. En este caso el riesgo relativo se ha estimado en 3.2 si se trata de afectación del área ileocólica o de 5.6 en afectación colónica exclusivamente. Si el diagnóstico de la enfermedad inflamatoria ocurre antes de los 30 años aumenta a 20.9³.

Los pacientes que han desarrollado con anterioridad un CCR, cáncer de ovario o útero tienen más riesgo que la población general.

La incidencia de CCR metacrónico se sitúa entre 1 y 9%. El intervalo entre un primer y segundo tumor se ha estimado en 8.7 años y esto marca la base del seguimiento con colonoscopia en pacientes con un primer tumor resecado⁴. Asimismo, una historia

personal de pólipos confiere un riesgo notable. Los pólipos son una protuberancia visible macroscópicamente que se proyecta en la superficie de una mucosa. Pueden ser pediculados o sésiles según su forma (ver fig 2). Los pediculados tienen un tallo de implantación de unos 1,5 cm e implican menos malignidad; los sésiles tienen una base de implantación amplia, sin tallo, de unos 2 cm e implican mayor malignidad.



Fig.2 pólipo sésil (izda) y pólipo pediculado (dcha)

En función de su histología, los pólipos colónicos pueden ser:

- adenomatosos (60-70%)
- hiperplásicos (10-30%)
- otros, como inflamatorios, hamartomatosos, mucosos.

La mayoría de los pólipos colorrectales, especialmente aquellos menores de 5 mm, son de tipo hiperplásico y no se consideran lesiones precancerígenas. Sin embargo, los adenomas se consideran un precursor importante del cáncer. Su incidencia aumenta con la edad, y se pueden encontrar hasta en un 25% de la población en torno a 50 años, y quizá en un 50% de los de más de 70⁵. Los adenomas surgen del epitelio glandular, presentan una morfología displásica y diferenciación anormal de las células epiteliales en torno a la lesión. Estudios longitudinales han demostrado un alto riesgo de desarrollo tumoral en individuos cuyos adenomas no se extirparon, y por otra parte se ha visto que la polipectomía disminuye el riesgo de cáncer. Por tanto el papel premaligno de los adenomas está bien establecido⁶. Según su histología pueden ser de tres tipos:

- Tubulares: se forman a partir de túbulos epiteliales, son pequeños, sésiles o pediculados. Es menos probable su transformación maligna (5%).

- Vellosos: se originan a partir de formaciones digitiformes o papilares de tejido conectivo que se recubren de células epiteliales. Suelen ser mayores que los tubulares, en su mayoría sésiles, y es el tipo que tiene mayor potencial de malignizar (40%)
- Tubulovellosos: con características de ambos tipos.

Sólo una fracción de los adenomas progresan a cáncer: los mayores de 1 cm se estima que tienen un 15% de probabilidades de originar un tumor maligno en 10 años⁷. Varias alteraciones genéticas hacen posible este proceso.

Cada uno de los defectos genéticos descritos en el modelo que se describe a continuación ocurre con elevada frecuencia sólo en una fase del desarrollo del tumor. Por ello se cree que cada fase es necesaria así como un orden relativo en la secuencia de las alteraciones para el desarrollo del carcinoma.

SECUENCIA ADENOMA-CARCINOMA

El concepto actual de carcinogénesis colorrectal implica una cascada de fallos genéticos que afectan a genes reparadores del DNA, a oncogenes y a genes supresores

de tumores. Vogelstein propuso un modelo que comienza en la displasia del epitelio previamente normal, sigue con adenoma⁸ temprano, adenoma tardío, carcinoma y metástasis; son cambios causados por alteraciones genéticas y que tardan normalmente décadas en producirse, de ahí la frecuencia de aparición de la patología en edad avanzada (Fig 3).

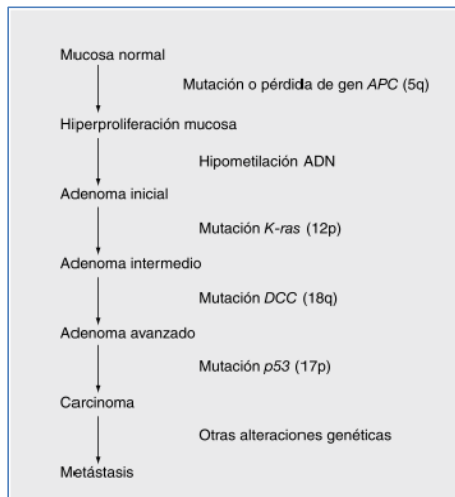


Figura 3: modelo de Vogelstein de carcinogénesis colónica

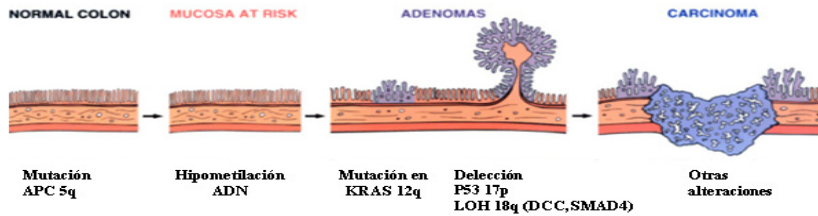


Figura 4: mutaciones adicionales al modelo Vogelstein

Considero que la acumulación de todas las mutaciones es más importante que el orden propuesto. La primera mutación en el epitelio normal es la delección de un fragmento del brazo largo del cromosoma 5 que incluye el gen APC (Adenomatous Poliposis Coli). La inactivación de la proteína APC es el paso necesario para empezar la proliferación celular que puede dar lugar a adenomas pequeños (<1 cm). En ellos, la hipometilación del ADN favorece la expresión aberrante de genes previamente silentes, se producen aneuploidías como resultado de la distribución de cromosomas durante la mitosis y pérdidas alélicas de genes supresores.

En adenomas grandes, mayores de 1 cm, aparece hasta en un 50% de casos una mutación en el gen K-RAS. El gen K-Ras mutado origina una proteína atrapada en su estado activado que envía de forma continua señales mitóticas e impide la apoptosis. Esto favorece el crecimiento del adenoma y la posible expansión clonal de alguna célula inicialmente alterada. En esta fase se puede observar sobreexpresión del oncogen bcl-2 en un 70% y alteraciones en c-myc (Fig 4).

A medida que progresa la evolución desde adenoma se pierden algunas alteraciones pero persisten las de *K-RAS* y *APC*, y se producen delecciones en 18q y 17p entre otras regiones, que implican los genes *DCC* (Deleted in Colon Carcinoma) y *p53*. La mutación en estos 2 genes provoca la aparición de carcinomas invasivos. Alteraciones posteriores en *Rb* o *c-myc* confieren malignidad.

Por tanto, el comportamiento clínico del CCR resulta de interacciones a muchos niveles. El reto es comprender las bases moleculares de la susceptibilidad al cáncer

colorrectal y determinar los factores que inician el desarrollo tumoral, dirigen su progresión y determina su sensibilidad o resistencia a los tratamientos antitumorales.

BASES MOLECULARES

INESTABILIDAD GENÓMICA

En esta enfermedad la pérdida de estabilidad genómica toma diversas formas, cada una con una causa diferente.

1. Inestabilidad cromosómica.

Es el tipo más frecuente, presente en el 80-85% del CCR esporádico. Causa numerosos cambios en el número de copias y estructura de cromosomas, que resultan de la pérdida de función de genes supresores tumorales como APC, p53, y SMAD4. En contraste con otros cánceres, el CCR no suele conllevar amplificación génica o reordenamiento genético (tabla 1)

Tabla 1 Modelos de Inestabilidad genómica en cáncer Colorrectal			
Tipo inestabilidad	Tipo defecto	Genes implicados	Fenotipo
Inestabilidad cromosómica	Somático	LOH* APC, P53, SMAD4	En 80-85% CCR esporádico
Defectos DNA MMR CCHNP	Germinal	Mutaciones en MLH1, MSH2, MSH6	Múltiples primarios CCR, progresión tumoral acelerada, riesgo aumentado tumores endometrio, gástrico y uroteliales
Esporádicos	Somático	Metilación MLH1	CCR poco diferenciado, colon derecho, menos agresivos que tumores sin defectos MMR
Fenotipo Metilador Islotes CpG	Somático	Locus MLH1, MINT1, MINT2, MINT3	En 15% CCR esporádico, presenta deficiente MMR por pérdida expresión MLH1
Defectos BER**	Germinal	MYH	Poliposis (+ 15 adenomas) con riesgo CCR
*Loss of Heterozygosity			
**Base Excision Repair			

2. Defectos de genes reparadores.

Es el caso de los genes reparadores de errores de apareamiento (mismatch repair, *MMR*). Esta inactivación puede ser heredada, como en el Cáncer de Colon Hereditario - No Polipósico (CCHNP); o adquirida, habitualmente por hipermetilación y consiguiente silenciamiento.

En el caso del cáncer no familiar, la hipermetilación bialélica de la región promotora del gen *MLH1* a nivel somático es causante del 15% de los cánceres esporádicos. Se asocian con edad elevada y sexo femenino. Su comportamiento clínico es menos agresivo.

El CCHNP supone el 5-10% de todos los casos de carcinoma colorrectal. La malformación aparece sobre todo en el colon derecho, próximo a la flexura esplénica, su estudio anatómo-patológico suele mostrar células en anillo de sello, diferenciación mucinosa, reacción linfocitaria tipo Chron y pobre diferenciación. Defectos en línea germinal en *MLH1* y *MSH2* principalmente, confieren un riesgo de un 80%, y supone una aceleración de la evolución de mucosa normal a carcinoma. Aparece unos 20 años antes que en la población general, sobre los 45 años. Tiene un patrón hereditario autosómico dominante. Para el desarrollo tumoral es preciso además de la mutación germinal una segunda mutación somática, del tipo de inestabilidad de microsatélites (MSI), que conduce a la inactivación de genes supresores como los que codifican el receptor tipo II de del factor de crecimiento transformante β (*TGF- β*) y la proteína X asociada a Bcl-2 (*BAX*).

Otra ruta alternativa que implica genes reparadores es la inactivación germinal de un

gen reparador de excisión de bases, *MYH*, que escinde del ADN la guanina oxidada. Portar 2 alelos inactivos implica un fenotipo polipósico con un riesgo de CCR del 100% a los 60 años⁹.

3. Metilación aberrante de ADN

Las ADN metilasas añaden un grupo metilo a la citosina en su carbono 5 con lo que define una 5ª base de ADN, 5-metilcytosina. En tejidos normales, la metilación ocurre en regiones

Bases Moleculares

- ✓ Inestabilidad genómica
- ✓ Inactivación genes supresores
- ✓ Activación oncogenes

fuera de los exones, pero en el CCR es frecuente en las islas CpG de ciertas regiones promotoras. En el CCR esporádico con inestabilidad de microsatélites, la silenciación epigenética bloquea la expresión de *MLH1*. El fenotipo Metilador de Islas de CpG se observa en el 15% de los cánceres esporádicos.

INACTIVACIÓN DE GENES SUPRESORES

1. *APC*

Como propuso Vogelstein en el 90, la mutación del *APC* es crítica en la carcinogénesis de colon. La proteína APC forma parte del complejo proteolítico de β -catenina. La inactivación *APC* implica la acumulación de β -catenina, que unida a factores como TCF-Lef (T Cell Factor – lymphoid enhancer factor), activa la ruta Wnt lo que supone un aumento de proliferación y evasión de apoptosis. Las mutaciones en línea germinal de *APC* están presentes en el 80-90% del otro síndrome de CCR familiar más frecuente. Afecta al 0.01% y se transmite con un patrón autosómico dominante, con una penetrancia del 100%. Se caracteriza por la presencia de cientos, incluso miles de adenomas o pólipos adenomatosos entre la segunda y tercera década de la vida con alta tasa de transformación maligna, de tal manera que a los 40 años todos los portadores han desarrollado un cáncer. La localización más frecuente es en el colon izquierdo, con histopatología similar a la de los esporádicos¹⁰. Un pequeño subgrupo de pacientes con *APC* wt, presentan mutaciones de la β -catenina que igualmente implican inactivación del complejo de degradación de la proteína y activación de la ruta de activación nuclear Wnt.

2. *p53*

En la mayoría de los tumores están los 2 alelos de *p53* inactivados, normalmente por una mutación de tipo missense en uno de ellos y por delección del 17p en el segundo alelo. La función del *p53* wt es mediar el arresto celular y actuar de control de muerte celular; se activa por múltiples mecanismos de estrés celular. Su inactivación suele coincidir con la transformación de adenomas grandes en carcinomas invasivos.

3. *TGF- β*

Un tercio de los tumores colorrectales tienen mutaciones somáticas que inactivan *TGFBR2*, normalmente por defectos en la reparación de apareamiento (*MMR*). En la mitad de los *wtMMR*, la ruta TGF- β se inactiva por mutaciones *missense* que afectan al dominio quinasa *TGFBR2* o por mutaciones o deleciones que inactivan el componente *SMAD4* u otros factores de esta familia que se sitúan *downstream* en esta ruta. La inactivación de esta ruta coincide con la transición de adenoma a displasia de alto grado o carcinoma.

ACTIVACIÓN DE ONCOGENES

1. *RAS* y *BRAF*

En adenomas grandes, mayores de 1 cm, aparece hasta en un 50% de casos una mutación en el gen *K-RAS*. La proteína K-RAS codifica una señal de transducción molecular y oscila entre un estado activado por la unión al trifosfato de guanosina (GTP) y un estado inactivado por la unión al difosfato de guanosina (GDP). El gen *K-RAS* mutado origina una proteína atrapada en su estado activado que envía de forma continua señales a *BRAF*. Aparece en un 37% de CCR. La mutación en *BRAF* implica una actividad continua de tipo serina-treonina quinasa. Se encuentra en un 13% de los CCR. Ambas rutas oncogénicas suponen la activación de la ruta de señalización de la proteína quinasa mitógeno-activada (MAPK), con resultado de proliferación celular y evasión de apoptosis. Las mutaciones en *BRAF* aparecen en pólipos más pequeños que las *KRAS*, y se asocian al síndrome de poliposis hiperplásica con un riesgo elevado de desarrollar CCR.

2. *PI3K*

Un tercio de los CCR portan mutaciones somáticas en la ruta Fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) o pérdida de función de *PTEN*, inhibidor de la ruta PI3K, con resultado de estimulación de esta vía implicada en supervivencia celular y evasión de apoptosis.

El estudio del genoma completo de tumores primarios y de metástasis a distancia en el mismo paciente ha mostrado la sorprendente coincidencia en las mutaciones, lo que implica que no se requieren nuevas mutaciones para que se desprendan células tumorales y prendan a distancia. El hecho de que todas las mutaciones de la metástasis estén presentes en el primario implica que la diseminación es rápida, requiere menos de 24 meses desde la aparición de la última mutación en el tumor primario.

El reto actual del conocimiento molecular de la enfermedad reside en trasladar los hallazgos en la genómica del CCR a tests clínicos con utilidad pronóstica o predictiva. Como hemos descrito, ya se conocen mutaciones en línea germinal en genes supresores de tumor que indican un riesgo elevado de cáncer, y se usan para guiar el seguimiento y medidas preventivas como cirugía profiláctica. Es el caso de las mutaciones en APC causantes del síndrome de Adenopoliposis Familiar y en los reparadores MLH1, MSH2 y MSH6 asociados al Cáncer de Colon Hereditario No Polipósico.

En cuanto a los marcadores predictivos, sólo la mutación en el gen *KRAS* como factor predictivo negativo de respuesta a anticuerpos anti-EGFR se usa de forma rutinaria en la práctica asistencial. Sin embargo, el conocimiento de variantes en genes implicados en la ruta de los fármacos habituales de cáncer de colon, podría ayudar a predecir el comportamiento del tumor ante el tratamiento. Del estudio de esta relación entre las diferencias genéticas individuales y la respuesta a los fármacos se ocupa la farmacogenética.

ANATOMÍA PATOLÓGICA

El colon y el recto forman el segmento del sistema digestivo conocido comúnmente como el intestino grueso. Se define como la porción del intestino desde la válvula íleo-cecal hasta el ano, su longitud es de aproximadamente 150 cm. Se divide en cinco segmentos definidos por el aporte vascular y por su localización extraperitoneal o retroperitoneal: el ciego (con el apéndice) y el colon ascendente, el colon transverso, el colon descendente, el colon sigmoide, y el recto.

El colon derecho está formado por el ciego (con el apéndice) y el colon ascendente. Es anterior al riñón derecho y el duodeno. Recibe su aporte vascular de las ramas de la arteria mesentérica superior (SMA). El SMA se divide en la arteria cólica media y el tronco de la SMA. La arteria cólica media forma dos o tres grandes arcadas en el mesocolon transverso. La arteria cólica derecha nace como una rama separada de la SMA en el 10,7% de los casos¹¹. El colon derecho es una estructura retroperitoneal.

El colon transverso está irrigado por ramas de la arteria cólica media. Es la primera porción del colon considerado intraperitoneal, y su longitud puede variar. Sus límites están definidos por el ángulo hepático por la derecha y por la flexura esplénica a la izquierda. Ambos puntos son fijos. El ángulo hepático colinda con la fosa vesicular, mientras que el ángulo esplénico es anterior al hilio del bazo y la cola del páncreas. El colon descendente vuelve a ser una estructura retroperitoneal¹², y se define como el segmento de colon, desde el ángulo esplénico hasta el colon sigmoide. El colon descendente es el primer segmento del lado izquierdo del colon y recibe su suministro de sangre a través de la arteria mesentérica inferior (AMI). Ésta nace de la aorta y da origen a la arteria cólica izquierda así como a las tres o cuatro arterias sigmoideas, que suministran al colon sigmoide intraperitoneal.

El recto es una estructura predominantemente extraperitoneal y suele dividirse en tres porciones, el tercio bajo, que es un área de aproximadamente 3 a 6 cm desde el margen anal, el tercio medio de 6 a 8-10 cm y el tercio superior suele extenderse hasta aproximadamente 12- 15 cm del margen anal.

Internamente el recto presenta unos pliegues mucosos de la pared hacia la luz que son las valvas de Houslon. La cara posterior del recto está rodeada del mesorecto, que incluye las estructuras vasculares y linfáticas. La fascia propia del mesorecto forma una barrera natural entre éste y la fascia presacra dejando un espacio avascular entre ambos y es de especial importancia para realizar la exéresis total del mesorecto.

El aporte sanguíneo del recto proximal se realiza a través de la arteria hemorroidal superior, rama de la arteria mesentérica inferior; el drenaje venoso finaliza en la vena porta a través de la vena mesentérica inferior; el drenaje linfático discurre en paralelo al sistema arterial. El tercio medio y distal del recto reciben aporte sanguíneo de las arterias hemorroidales media e inferior respectivamente, ramas de la arteria iliaca interna, recorrido que también comparte el sistema linfático; el drenaje venoso se realiza a través de las venas hemorroidales correspondientes, que se dirigen hacia la vena cava inferior.

El drenaje linfático del recto medio y proximal se realiza fundamentalmente hacia los ganglios presacros y hacia los ganglios de las cadenas iliacas internas. El drenaje linfático del recto distal, por debajo de la línea dentada, se realiza hacia las cadenas ganglionares inguinales y las iliacas externas.

La existencia en el recto de un sistema venoso doble, hace que los tumores rectales tengan dos posibles vías de diseminación sanguínea: la primera hacia el hígado a través de la vena porta, y la segunda hacia el pulmón a través de la vena cava inferior.

El cáncer colorrectal tiene tres tipos de diseminación: a) locorregional, a través de la submucosa y la capa muscular, lateralmente hacia las estructuras adyacentes y a los linfáticos regionales; b) invasión venosa por vía portal, con metástasis a distancia y sobre todo hepáticas, y c) extensión transcelómica que da lugar a carcinomatosis peritoneal.

El 60% de los cánceres colorrectales se localizan en el colon, un 50% en colon izquierdo y el 50% en colon derecho y transversal, el 40% restante se localiza en recto o unión rectosigmoidea. Se define tumor rectal si el extremo distal se localiza a menos de 16 cm del anillo anal, y tumor colónico si se encuentra por encima de dicha localización.

Con respecto al grado de diferenciación la mayoría de los patólogos utiliza los criterios de Broders para describirlo de acuerdo con la cantidad de estructuras glandulares, la polaridad de los núcleos y la orientación basal en grados de severidad: Grados 1, 2, 3, y 4. Las células de grado 1 son por lo general tumores bien diferenciados o tumores de bajo grado, y generalmente se consideran como los de comportamiento menos agresivo. Por el contrario, las células de los tumores de grado 3 o 4 son tumores precariamente diferenciados o tumores de alto grado no diferenciados, y generalmente son los de comportamiento más agresivo.

ESTADIAJE

Hasta hace poco la estadificación del CCR más utilizada era la de Dukes¹³, cuya clasificación es la siguiente: **Estadio A:** Tumor no penetrante en la pared intestinal **Estadio B:** Tumor penetrante en la pared intestinal sin metástasis en nódulos linfoides **Estadio C:** Tumor penetrante en la pared intestinal con metástasis en nódulos linfoides de la misma región **Estadio D:** Tumores que se han extendido a lugares distantes (por ejemplo, hígado o pulmón) pero no considera el número de ganglios afectados ni el compromiso de estructuras adyacentes al tumor como aspectos diferenciales para considerar grupos de pronóstico adverso. Posteriormente fue modificada por Astler y Collier¹⁴ (MAC)

Actualmente la estadificación se establece a partir de la clasificación TNM del American Joint Committee on Cancer¹⁵ (AJCC) que proporciona información de la infiltración a través de la pared definida por el tamaño (T), la afectación ganglionar definida a través del número de ganglios (N) y la presencia o no de metástasis a distancia (M) (Tabla 2). Al diagnóstico, aproximadamente el 14% de los pacientes se presentan con un tumor estadio I, el 28% con un estadio II, el 37 % con un estadio III y el 21% con un estadio IV.

Estadio	T	N	M	Dukes*	MAC*
0	Tis	N0	M0	-	-
	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T4a	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
	T1-T2	N2b	M0	C	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	Any T	Any N	M1a	-	-
IVB	Any T	Any N	M1b	-	-

Tabla 2: sistemas de estadiaje UICC, Duke’s y MAC

DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE EXTENSIÓN

La sintomatología suele aparecer en fases avanzadas de la enfermedad y suele estar influida por la localización del tumor primario. Los síntomas pueden incluir cambios en

el ritmo intestinal, estreñimiento persistente, diarrea, tenesmo, rectorragias que suelen orientar hacia una posible neoplasia rectosigmoidea, mientras que las heces melénicas pueden corresponder a tumores situados en colon derecho.

Las pruebas diagnósticas utilizadas se presentan a continuación:

Radiología: la radiografía abdominal simple es sólo útil en el caso de los pacientes que se presentan como una emergencia con sospecha de obstrucción intestinal o perforación. El enema opaco es una prueba inicial ampliamente utilizada en los pacientes en que se sospecha un CCR.

Diagnóstico de certeza:

- ✓ Examen físico
- ✓ Análisis sanguíneo
- ✓ Enema opaco
- ✓ colonoscopia
- ✓ biopsia

El enema de doble contraste no está indicado de entrada, ya que las lesiones pueden pasar desapercibidas, tampoco es útil para valoración de la zona anastomótica. Estaría indicado ante la imposibilidad de realización de colonoscopia completa o mala tolerancia por parte del paciente. La tomografía computarizada¹⁶ (TC) del hígado se utiliza para detectar enfermedad metastásica, aunque también puede ser

usada para valorar la extensión local, sobre todo en los tumores de recto.

Endoscopia: la endoscopia¹⁷ de fibra óptica proporciona un método simple para visualizar directamente y biopsiar lesiones sospechosas de malignidad. Este método es

Diagnostico de extensión

- ✓ Bioquímica hepática
- ✓ Marcadores tumorales
- ✓ RX tórax
- ✓ ECO/TC hígado
- ✓ ECO endorecto (Ca recto)
- ✓ PET

más sensible que el enema de doble contraste baritado en la detección de adenomas pequeños y permite la biopsia o excisión total de lesiones accesibles. La colonoscopia¹⁸ facilita el estudio de todo el colon, informa acerca de la localización, el tamaño, la presencia de otras lesiones sincrónicas y la

toma de biopsia para el estudio anatomopatológico.

Ultrasonografía: la ecografía puede ser utilizada para detectar metástasis hepáticas (siendo un método tan sensible y más barato que la TC) y para establecer la extensión local del tumor, fundamentalmente en los casos de cáncer de recto. La ecografía endorectal es utilizada en los tumores de localización rectal, determina el grado de invasión a través de la pared con una sensibilidad del 80-90%, y la afectación ganglionar con sensibilidad del 50-75%.

Tomografía con emisión de positrones (PET): puede ser más sensible y específica en la detección de metástasis que la TC. En otro estudio prospectivo reciente en que se estudia la sensibilidad de las diferentes técnicas, se observa una mayor sensibilidad para la detección de metástasis hepáticas que TC y RM, pero la PET es más específica. La combinación TC-PET sería más sensible para la detección de enfermedad extrahepática que la TC sola.

Marcadores tumorales: el antígeno carcinoembrionario¹⁹ (CEA) no es lo suficientemente sensible ni específico para ser considerado un marcador diagnóstico primario. Preoperatoriamente puede ser utilizado como un indicador pronóstico si está elevado.

TRATAMIENTO

CIRUGÍA

La resección quirúrgica es el único tratamiento curativo en la enfermedad locorregional. La supervivencia dependerá de la extensión de la enfermedad. La cirugía óptima debe ser realizada por cirujanos expertos, con un muestreo adecuada de ganglios linfáticos regionales, al menos 12, y márgenes de resección libres. Las tasas de supervivencia a 5 años registradas en la base de datos americana SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) entre 1991 y 2000 fueron:

- Estadio I (T1-2 N0) — 93 %
- Estadio IIA (T3N0) — 85 %
- Estadio IIB (T4N0) — 72 %
- Estadio IIIA (T1-2 N1) — 83 %
- Estadio IIIB (T3-4 N1) — 64 %
- Estadio IIIC (N2) — 44 %

En los pacientes con estadios I, II, III, la recurrencia se piensa que se debe a las micrometástasis ocultas en el momento de la cirugía. El objetivo del tratamiento adyuvante es disminuir el riesgo de recurrencias y aumentar así la tasa de curación.

La cirugía constituye la base fundamental del tratamiento del CCR y el objetivo fundamental es realizar una resección radical del tumor primario con amplios márgenes así como de los ganglios linfáticos regionales.

COLON

Las lesiones en el ciego y colon ascendente se manejan con una hemicolectomía derecha. El colon²⁰ derecho se moviliza desde el retroperitoneo mediante la incisión de sus anexos retroperitoneales con cuidado, para evitar lesiones en el uréter, la vena cava inferior, el duodeno, y los vasos gonadales. El colon se moviliza a partir del íleon al colon transverso con cuidado en el ángulo hepático para no perjudicar a la vesícula biliar o el duodeno. Las ramas ileocólica, cólica derecha, y a la derecha de los vasos

cólicos medios son ligados y divididos. Una vez que el aporte vascular²¹ se divide y el tejido que interviene en la mesentérica se liga y se divide, la atención puede dirigirse a la resección de los tejidos del colon.

Cuando el colon derecho se elimina, la continuidad intestinal puede ser restablecida mediante la creación de una anastomosis entre el íleon terminal y el resto del colon transversal.

Para lesiones localizadas en el colon²² transverso, pueden llevarse a cabo una variedad de enfoques. Las lesiones que son en las proximidades y cerca del ángulo hepático se puede resecar con una hemicolectomía derecha extendida seccionando la arteria cólica media en su raíz. Del mismo modo, una lesión en el colon transversal distal se puede resecar con una hemicolectomía izquierda extendida, que se describe con más detalle más adelante en la resección del colon descendente. Para las lesiones que se encuentran en la porción media del colon transversal se puede realizar una colectomía transversal con anastomosis término-terminal, este procedimiento requiere una movilización del colon derecho.

El uso de abordajes laparoscópicos²³ (LAC) para la resección de lesiones malignas en el colon, ha sido recibido con entusiasmos mixtos debido a que en el mayor estudio aleatorizado multicéntrico donde se comparaba LAC con colectomía abierta se observó que TLP y la tasa de SG a los 3 años fue similar en ambos brazos, mientras que la recuperación postoperatoria fue más rápida en el grupo de LAC con una menor estancia hospitalaria y un menor uso de analgésicos

En los casos en los que deba hacerse una cirugía de urgencia por aparición súbita de una oclusión intestinal, perforación o hemorragia, deberá intentarse una cirugía radical con resección y anastomosis²⁴, sobre todo en las lesiones en el lado derecho del colon, sin embargo en las lesiones del lado izquierdo puede ser necesaria la práctica de una doble colostomía u operación de Hartmann (resección en bloque más colostomía del muñón cólico proximal y cierre del muñón distal)

RECTO

Por el contrario, en la neoplasia de recto debido a que se sitúa sobre el marco óseo pélvico la cirugía plantea una mayor dificultad, produciéndose casi la mitad de las recurrencias a ese nivel. El riesgo de recurrencia está relacionado con la profundidad de la extensión tumoral en la pared intestinal y la presencia de afectación ganglionar, ascendiendo desde un 5-10% en estadios I a un 30-50% en estadios III.

Con la introducción de la exéresis total del mesorrecto²⁵ se ha producido una importante reducción de la tasa de recidiva local, debido a que el mesorrecto es una estructura que contiene toda la vascularización y drenaje linfático del recto. La cirugía mesorrectal total se define por la extirpación en bloque del tumor y el correspondiente mesorrecto asegurando unos márgenes adecuados, en particular el margen radial que ha resultado ser el más importante en relación al riesgo de recidiva local²⁶. La mayoría de los autores han observado tasas elevadas de recidiva local cuando, en el examen del margen radial, el tumor se encuentra a menos de 1 mm del borde quirúrgico. Si el tumor se encuentra a menos de 1 mm del margen radial, se considera que éste está afecto y que la exéresis tumoral ha sido incompleta. Sólo en un estudio se ha observado que el margen radial es seguro cuando es igual o mayor a 2 mm. La presencia de infiltración tumoral del margen radial es más frecuente cuando se realiza una resección abdominoperineal APR que cuando se realiza una resección anterior baja RAB²⁷. La presencia de infiltración tumoral del margen radial, y por tanto la recidiva local, es aún más frecuente en los tumores localizados en el tercio distal del recto e intervenidos mediante APR, lo que podría explicarse por la dificultad que supone la disección del mesorrecto a ese nivel²⁸.

Si bien la cirugía del cáncer de recto tiene una finalidad curativa, también sería deseable, en la medida de lo posible, preservar el esfínter por la repercusión que ello supone en la calidad de vida de los pacientes. En los tumores localizados en el tercio superior y medio del recto se puede realizar una resección anterior baja (RAB), que permite la conservación del esfínter. En los tumores localizados en el tercio distal del recto, la cirugía más habitual ha sido la resección abdominoperineal (APR), y conlleva la realización de una colostomía de derivación permanente. La APR es la cirugía

practicada en el 40% al 60% de los tumores rectales²⁹. La radioquimioterapia preoperatoria puede disminuir el tamaño y el estadio de los tumores del recto.

El estadio patológico (pTNM) se determina tras la cirugía mediante el examen anatomopatológico de la pieza quirúrgica³⁰. La subestadificación o disminución del estadio tumoral (T) se define por la obtención de estadios postoperatorios tumorales (ypT) inferiores a los que presentan estos mismos tumores antes del tratamiento con radioquimioterapia (cT). De igual forma, la subestadificación ganglionar se refiere a la observación de un estadio ganglionar postoperatorio inferior (ypN) al estadio ganglionar previo al tratamiento con radioquimioterapia (cN). El grado de regresión tumoral, define la proporción de tumor viable y de fibrosis en los tumores después de haber sido tratados con radioterapia o radioquimioterapia preoperatorio, ha sido analizado por diferentes autores^{31,32}. Una de las clasificaciones usadas es la de Mandard y cols en donde el Grado de regresión 1 se definió como la ausencia de células tumorales viables en el tumor primario (ypT0), y en los ganglios linfáticos (ypN0), Grado II como alguna célula neoplásica con claro predominio de fibrosis, Grado III, presencia de células neoplásicas en la pieza y fibrosis predominante y Grado IV como predominio de células neoplásicas sobre el componente fibrótico. La resecabilidad fue definida como la resección macroscópicamente completa del tumor y de los ganglios patológicos

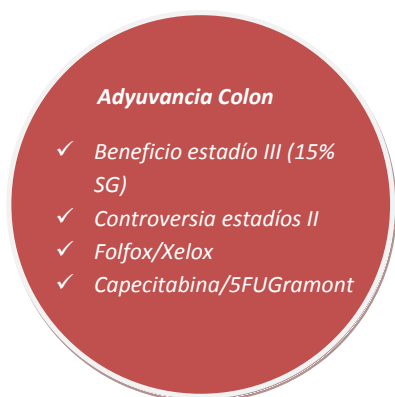
El estudio de los márgenes quirúrgicos define el grado de resección tumoral (R0, resección completa con márgenes libres; R1, resección incompleta con infiltración microscópica de los márgenes; R2, resección incompleta con infiltración macroscópica de los márgenes). Como datos complementarios a los recogidos en la clasificación TNM, una adecuada estadificación patológica debe incluir los siguientes parámetros: el grado de diferenciación tumoral; el número de ganglios linfáticos extirpados y el número de ganglios linfáticos con metástasis; el estado de los márgenes quirúrgicos proximal, distal y radial; y el grado de regresión tumoral en tumores que han recibido tratamiento neoadyuvante (radioterapia o radioquimioterapia).

TRATAMIENTOS NO QUIRÚRGICOS

COLON

ESTADIOS II, III

Los primeros estudios de 5 fluorouracilo (5-FU) en monoterapia no consiguieron demostrar un beneficio en la supervivencia frente a cirugía sola. La incorporación de inmunomoduladores como leucovorin (LV) o levamisol resultó prometedor. Visto en retrospectiva, los ensayos estaban limitados por un número insuficiente como por adherencia subóptima a la terapia. Ensayos fase III randomizados y mejor realizados demostraron que 5FU o 5FU más leucovorin mejoraban los resultados previos³³. En 2003 el grupo colaborativo francés GERCOR probó que 5FU en infusión de 48 horas con leucovorin tenía una eficacia similar a los regímenes ensayados hasta el momento en bolus, pero un perfil mejor de seguridad, y así el llamado régimen De Gramont ganó popularidad en Europa. Un análisis de pacientes con estadio III incluidos en 7 ensayos demostraba que la quimioterapia adyuvante mejoraba la probabilidad de estar libre de recurrencia a los 5 años de 42% a 58%, y la supervivencia global a 5 años de 51 a 64%. Más recientemente, dos ensayos randomizados que comparaban uracilo + tegafur o capecitabina a 5FU intravenoso mostraron una eficacia equivalente. Asimismo, el beneficio de la terapia adyuvante se mantiene en la población geriátrica.



Por otra parte, la adición de oxaliplatino e irinotecan a 5FU/LV había mejorado claramente la tasa de respuestas y supervivencia en la enfermedad metastásica y con la misma esperanza se evaluaron en la enfermedad localizada. El ensayo MOSAIC comparó la combinación de 5FU infusional/LV y oxaliplatino, conocido como FOLFOX4, con 5FU infusional/LV en más de 2000

pacientes, un 40% estadio II y 60% estadio III. El esquema consistía en oxaliplatino 85 mg/m² en 2 horas con LV en Y 200 mg/m² seguido de 5FU 400 mg/m² en bolo y 5FU 600mg/m² en infusión continua de 22horas el día 1, y LV 200 mg/m² seguido de 5FU 400 mg/m² en bolo y 5FU 600mg/m² en infusión continua de 22horas el día 2, cada 14 días y por 12 ciclos. Con una mediana de seguimiento de 82 meses, la SLE a 5 años fue significativamente mayor con FOLFOX (73 versus 67 %, hazard ratio [HR] 0.80). Además la Supervivencia Global a 6 años (SG₆) también fue significativamente mejor, en general (79 versus 76 %, HR 0.84, p = 0.046), y en los estadios III (73 versus 69 %, HR 0.80, p = 0.023), pero no en los estadios II. En un análisis exploratorio de los estadios II se encontró una diferencia en SLP favorable al grupo de FOLFOX en el subgrupo de tumores de alto riesgo, pero no fue estadísticamente significativa (82 versus 75 %, HR 0.72)

Por estas razones FOLFOX es el esquema preferido y recomendado por las guías clínicas NCCN sobre monoterapia de 5FU/LV o capecitabina.

FOLFOX4 fue el esquema usado en el ensayo de registro, sin embargo se tiende a utilizar versiones como el FOLFOX6 modificado, sin 5FU bolus del día 2, o FOLFOX 7 modificado, que suprime los 2 bolus, para así permitir el régimen en infusión ambulatoria durante 2 días sin acudir al Hospital de Día.

La neutropenia febril así como la diarrea grado 3 ó 4 (CTCv3.0) fueron más frecuentes en el grupo de FOLFOX, 1.8% vs 0.2%, y 10.8% vs 6.6% respectivamente. Además, un 92% de los pacientes sufrieron algún grado de neuropatía periférica, un 13% grado 3. A los 2 años solo persistía en un 12% como grado 1, 3% como grado 2 y 0.7% como grado 3.

A pesar de la actividad de irinotecan en la enfermedad avanzada, el estudio PETACC-3 falló en demostrar su eficacia en reducir el riesgo de recidivas en la adyuvancia de la enfermedad localizada. Se estudiaron 3.278 pacientes (71 % estadio III) randomizados a 5FU/LV en infusión corta con o sin irinotecan (180 mg/m² el día 1 cada 14 días por 6 ciclos. Ni siquiera en los estadios III resultó beneficioso irinotecan: SLE a 5 años 57% vs 54%; SG 74% vs 71%.

El valor de la adyuvancia en los estadios II sigue siendo controvertido. Tres grandes ensayos y una revisión de 5 ensayos pequeños han estudiado el beneficio de la

quimioterapia en esta población. Ningún análisis randomizado ha demostrado beneficio en este grupo de pacientes. El ensayo QUASAR randomizó 3.238 pacientes (91% Duke's B) a 5FU más leucovorin (LV), con o sin levamisol o observación tras resección de cáncer de colon (71%) o recto^{34,35}. La quimioterapia adyuvante se asoció con un 22% de disminución de riesgo de recurrencia y un 18% de reducción de muerte, ambos datos con significación estadística, que se tradujo en un beneficio absoluto de 3 a 4% en la SG a 5 años. Entre pacientes con cáncer de colon estadio II (n = 2146), solo se vio una tendencia a mejor SG (hazard ratio [HR] 0.86, 95% CI 0.54 - 1.19). Del mismo modo, el estudio IMPACT B2 que analiza conjuntamente datos de 1016 pacientes con enfermedad T3N0 reclutados en 5 ensayos similares de observación versus 5-FU/LV, mostró una tendencia a mejor Supervivencia libre de evento en los pacientes que recibían quimioterapia (76% vs 73%), y la SG fue similar (82% vs 80%)³⁶.

Lo cierto, es que ninguno de estos ensayos reclutó los estimados 4000 pacientes para encontrar una diferencia significativa en SG³⁷.

METANÁLISIS ESTADIO II

Asimismo, varios Metanálisis han evaluado el aporte de la quimioterapia en este estadio. En los 2 que se describen a continuación se ha encontrado beneficio:

- Metanálisis del Intergrupo — se estudiaron 3.302 pacientes con estadios II o III incluidos en 7 ensayos que comparaban 5FU modulado con LV o levamisol frente a cirugía sola³⁸. En el análisis multivariable ajustado por T y N, grado histológico, la quimioterapia adyuvante se asoció a un 30% de reducción en el riesgo de recurrencia y un 26% de reducción en el riesgo de muerte, ambas con significación estadística. Para el estadio II, suponía una SLE a 5 años mayor (76% vs 72%) pero solo una tendencia a mayor SG (81% vs 76%)
- Metanálisis del Grupo Cancer Care Ontario— se trata de una revisión sistemática de 37 ensayos y 11 metanálisis. En un subgrupo de 12 ensayos (4.187 pacientes) que comparaban cirugía sola frente a quimioterapia basada en 5FU, la adyuvancia se asoció a un beneficio pequeño pero significativo en la SLE, entre 5% y 10%, pero no se traducía en beneficio en la SG (RR= 0.87, 95% CI 0.75-1.10, p = 0.07).

Un estudio reciente sugiere el posible efecto deletéreo de la quimioterapia basada en 5FU en estadios II con inestabilidad de microsatélites, pero sí se mantenía la ventaja esperada en los estadios III³⁹.

Con estos datos, las guías clínicas recomiendan considerar quimioterapia adyuvante en los estadios II solo cuando concurren factores que confieren alto riesgo de recidiva: T4, grado indiferenciado (3 ó 4), invasión linfovascular, debut con obstrucción o perforación intestinal, márgenes quirúrgicos infiltrados por tumor, o muestreo de ganglios insuficiente (< 12).

ESTADIO IV

Un 15%-20% de los pacientes tienen metástasis hepáticas al diagnóstico y al menos otro 40% desarrollarán metástasis después de una presentación inicial como enfermedad localizada. El 60% de ellos tendrán enfermedad hepática. El drenaje del colon por la vena porta explica este patrón de expansión de la enfermedad preferentemente al hígado. El segundo lugar en frecuencia de aparición de lesiones es el pulmón. Para un porcentaje entre el 40% y 50% de pacientes, oligometastásicos y de localización única en hígado o pulmón, la metastectomía puede suponer SG a 5 años de 40%, incluso de 50% en pacientes seleccionados⁴⁰. El avance de las técnicas quirúrgicas, junto con ablación por radiofrecuencia, embolización de la vena porta y la mayor tasa de respuestas que se consigue con los nuevos tratamientos quimioterápicos, han permitido rescatar algunos pacientes cuya enfermedad era considerada inicialmente irresecable. Esta tasa de conversión va desde un 13% a 16% en distintas series⁴¹. la tasa de curación, definida como SLE a 5 años, en pacientes inicialmente irresecables con el uso de estrategias multidisciplinarias que incluían cirugías en varios tiempos, se ha estimado por Adam y cols en 16%. En este caso, el objetivo de los tratamientos farmacológicos que se administren es conseguir la mayor tasa de respuestas a diferencia de las situaciones consideradas irresecables sin posibilidad de conversión donde sigue siendo clave las consideraciones generales de la enfermedad incurable: el aumento de SLP o SG con la mejor calidad de vida.

El tratamiento paliativo ha experimentado notables avances en los últimos 15 años, desde la aparición de irinotecan y oxaliplatino. La piedra angular del tratamiento farmacológico del cáncer colorrectal es el 5FU. La mediana de expectativa de vida de la enfermedad avanzada sin tratamiento sería de unos 6 meses⁴², y el uso de 5FU en monoterapia, dependiendo de si se usa modulado con LV o no, en bolus o infusión continua, consiguió ampliarla a un rango de 10 a 12 meses⁴³. La incorporación de irinotecan u oxaliplatino aumentó la mediana de SG a 14-16 meses⁴⁴. Y la posibilidad de utilizar todos los fármacos en un orden u otro consiguió los mejores resultados hasta la aparición de la terapia biológica: 21 meses.⁴⁵ Se desarrollaron ensayos con el fin de ver la mejor secuencia de estos esquemas, como el de Tournigand y cols, que randomizaba los pacientes en 1ª línea de tratamiento a FOLFIRI y a la progresión FOLFOX versus la secuencia opuesta. Encontraron una mediana de SG de 21.5 meses para FOLFIRI→FOLFOX vs 20.6 meses para FOLFOX→FOLFIRI, sin diferencias estadísticamente significativas (fig 5). La SLP hasta la 2ª línea tampoco fue diferente: 14.2 vs 10.9 respectivamente. Las diferencias se encontraron en el perfil de toxicidad, en la primera línea la mucositis y náusea o vómitos grado 3-4, y la alopecia grado 2 fueron más frecuentes para FOLFIRI, y la neutropenia grado 3-4 y toxicidad neuropsensorial en el brazo con FOLFOX⁴⁶.

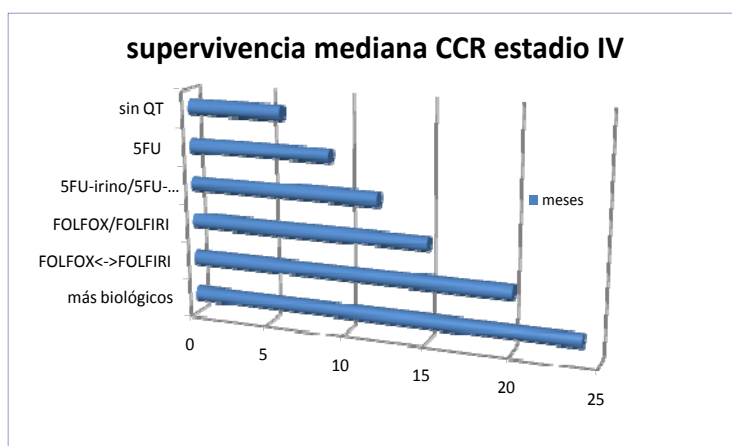


Figura 5: Evolución de la mediana de supervivencia global en cáncer colorrectal metastásico

Puesto que la clave parece conseguir que los pacientes reciban los 3 fármacos, 5FU, irinotecan y oxaliplatino, podría plantearse el reto de utilizar los tres juntos en una primera línea. Esta aproximación ha sido ensayada: el grupo griego estudió 283 pacientes en 1ª línea tratados con el esquema Douillard de 5-FU/LV más irinotecan versus FOLFOXIRI (5-FU/LV, oxaliplatino, and irinotecan). La SG mediana fue 21.5 vs 19.5 meses, tampoco hubo diferencias en el Tiempo a la Progresión (8.4 vs 6.9 meses) o en tasa de respuestas objetivas (43% vs 34%). Por otra parte, en otro ensayo italiano se sugería la superioridad de FOLFOXIRI frente a FOLFIRI, un fase III con 244 pacientes: el objetivo primario era la tasa de respuestas, 66 vs 41%, así que aumentaba el número de pacientes que accedían a metastectomía (15% vs 6%). También resultó favorable en SLP (9.8 vs 6.9 meses) y SG (22.6 vs 16.7 meses)⁴⁷.

Con esta controversia, no se puede recomendar el uso del triplete pues existen limitaciones importantes, como el reducido número de pacientes para un fase III del estudio italiano, el uso de tasa de respuestas como objetivo primario en un marco de enfermedad incurable, o las dosis usadas de 5FU del esquema Douillard en el griego, inferiores a las del FOLFIRI, más aceptado y adoptado en la práctica clínica.

El modelo de distintas líneas de quimioterapia en la que se utilizan fármacos sin resistencias cruzadas conocidas en sucesión hasta la progresión definitiva de la enfermedad está quedando caduco en beneficio de una estrategia de cuidado continuo. Esto implica una estrategia individualizada que puede incluir fases de mantenimiento con tratamientos menos tóxicos entre esquemas más agresivos, reutilización de fármacos en combinación con otros nuevos también activos, posibilidad de rescate quirúrgico en distintos tiempos, incluso después de distintas líneas, y selección de tratamientos menos tóxicos y más efectivos con el uso de los biomarcadores predictivos conocidos.

En los últimos años el esfuerzo en investigación se ha dirigido principalmente a la identificación de dianas terapéuticas específicas de las células tumorales para conseguir bloquear rutas esenciales de señalización implicadas en el crecimiento y supervivencia tumoral.

El primer ensayo fase II⁴⁸ realizado con bevacizumab evaluó la seguridad, eficacia y farmacocinética de la combinación de dos diferentes dosis de bevacizumab asociado a 5-FU y se encontró que la rama con bevacizumab a dosis de 5 mg/kg obtuvo los mejores resultados de eficacia. Este es un anticuerpo monoclonal contra el VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), impidiendo así su unión a sus receptores fisiológicos, VEGFR, implicados en la angiogénesis necesaria para la supervivencia y expansión tumoral.

El estudio pivotal que obtiene la indicación del bevacizumab en primera línea es el realizado por Hurwitz y cols. en pacientes con CCR metastático sin tratamiento previo de quimioterapia, en dónde fueron randomizados a recibir IFL más placebo, IFL con bevacizumab 5 mg/Kg cada dos semanas o 5FU/LV más bevacizumab a 5 mg/kg cada dos semanas. Demostraron que la adición de bevacizumab incrementaba de forma significativa la SLE de 6.2 a 10.6 meses, la tasa de respuestas (34.8 vs 44.8%) y la supervivencia global de 15.6 a 20.3 meses. En términos de toxicidad la hipertensión grado 3 fue más alta en el brazo de bevacizumab/IFL que en el de placebo/IFL (11% vs 2%). La incidencia global de eventos tromboembólicos y proteinuria no fueron estadísticamente significativos en ambos brazos, también se han producido dos toxicidades severas en el brazo que lleva el bevacizumab que son las perforaciones gastrointestinales y el tromboembolismo arterial.

El ensayo BICC-C fue diseñado para comparar los tres esquemas de irinotecan con distintas combinaciones de 5FU resultando el brazo de FOLFIRI el más favorable tanto en lo referente a eficacia como a toxicidad. Aunque la adición del bevacizumab ha sido secuencial y no randomizado, la adicción del anticuerpo a FOLFIRI demuestra un incremento en la SLE (9 vs 7.6 meses), en supervivencia global (28 vs 23 meses) y tasa de respuestas (63.2 vs 47%). El estudio TREE-2⁴⁹ ha investigado la combinación de bevacizumab con cada una de las tres combinaciones de oxaliplatino más habituales, siendo el objetivo primario la toxicidad grado 3-4 durante las doce primeras semanas de tratamiento. La adición de bevacizumab fue bien tolerada y se asoció a un incremento en la tasa de respuestas (41-53 %) y la mediana de supervivencia fue de 24.4 meses. Aunque estos datos son prometedores hay que valorarlos con cautela ya

que es una comparación indirecta entre dos ensayos (TREE-1, los mismos brazos de quimioterapia pero sin bevacizumab). La seguridad y eficacia del bevacizumab está siendo monitorizada en dos estudios observacionales que están en marcha, uno en EE.UU. (BRITE)⁵⁰ y otro europeo (BEAT)⁵¹.

Por otra parte, cetuximab, anticuerpo monoclonal contra el EGFR (Epidermal Groth Factor Receptor) se ha incorporado también al arsenal terapéutico del cáncer colorrectal metastásico. Los modelos preclínicos indicaban que cetuximab tenía una actividad limitada como agente único, pero mayor cuando se asociaba a otro citotóxico. En base a esta observación y en una experiencia favorable anecdótica de una respuesta importante en un paciente joven con enfermedad refractaria a irinotecan, se inició un ensayo fase II multicéntrico. Los pacientes fueron tratados con la misma dosis de irinotecan y pauta con que el paciente había presentado progresión, con la adición de cetuximab (400 mg/m² como dosis de carga, luego semanalmente 250 mg/m² durante 1 hora). Fueron tratados 121 pacientes que habían fracasado a un tratamiento previo con irinotecan, obteniéndose una tasa de respuesta del 22,5%. La toxicidad de irinotecan fue moderada. El tres por ciento de los pacientes experimentaron una reacción alérgica anafiláctica con cetuximab requiriendo la suspensión del tratamiento con cetuximab. La toxicidad más frecuente relacionada con cetuximab fue una erupción de la piel en forma de acné, que estuvo presente en el 75% de los pacientes, y un 12% experimenta una erupción cutánea de grado 3.

Alentados por los resultados obtenidos con irinotecan más cetuximab, Saltz y cols iniciaron un estudio fase II multicéntrico para evaluar la actividad como agente único en pacientes con cáncer colorrectal refractario a irinotecan: cinco de 57 pacientes (9%) alcanzaron una respuesta parcial, un 37% una estabilización de la enfermedad y una SG de 6.4 meses. Posteriormente se reportaron los resultados del estudio BOND, cetuximab-irinotecan vs cetuximab monoterapia en 1ª línea de cáncer colorrectal metastásico con expresión de EGFR: la tasa de respuestas fue 23% vs 11%, TP=4.1 vs 1.5 meses (p=0.001) y la SG= 8.6 vs 6.9 meses (p=0.48). el 80% de los pacientes tuvieron rash cutáneo y la tasa de respuestas era mayor en ellos que en los que no presentaron rash (25.8% 6.3%, p=0.005) . Este estudio sirvió para su aprobación en

Europa y EEUU en pacientes refractarios a irinotecan con expresión de EGFR. Posteriormente se ha buscado su papel en la 1ª línea: el estudio fase II ACROBAT incluyó 62 pacientes con CCR metastásicos EGFR positivo que se trataron con FOLFOX-4 + cetuximab. Se consiguieron una tasa de respuestas del 72%, una SLP de 12.3 meses y una SG de 30 meses. La tasa de conversión para rescate quirúrgico de metástasis fue 23% (10 pacientes). Resultó ser un esquema altamente activo que inspiró otros ensayos fase III con el anticuerpo. El estudio CRYSTAL, fase III randomizado y multicéntrico, probó FOLFIRI vs FOLFIRI+cetuximab. Los resultados fueron más decepcionantes: TR= 39% vs 47%, OR= 1.40 (95% IC, 1.12-1.77; p=0.004) , TP= 8 vs 8.9 meses, HR para progresión con folfiri= 0.85; 95% ic; 0.72-0.99; p=0.048). No hubo diferencias en SG. Sin embargo se vio una interacción entre el estatus del gen K-RAS⁵² y la probabilidad de respuesta (p=0.03), aunque no con el TP (p=0.07).⁵³ Esto coincidió con los hallazgos del estudio de registro de panitumumab, otro anticuerpo monoclonal contra el EGFR, cuyo desarrollo clínico ya se hizo sobre la base del biomarcador K-RAS como predictivo negativo de respuesta en estado mutado. Esto se describe en el apartado dedicado a fármacos y biomarcadores detenidamente.

Panitumumab, al igual que cetuximab, empezó su desarrollo clínico en pacientes refractarios a los tratamientos convencionales. El estudio pivotal donde comparaban panitumumab 6 mg/kg/2 semanas + mejor cuidado de soporte vs mejor cuidado de soporte en pacientes que hubieran recibido 5FU/irinotecan/oxaliplatino, encontró los siguientes resultados: SLP 8 meses vs 7.3 meses, p<0.0001; TR= 10% vs 0; EE= 27% vs 10%, reacciones adversas grado 3-4= 16%. Un 40% de los pacientes en el grupo activo y un 46% en el grupo control presentaban mutaciones en el gen K-RAS. En una extensión del estudio se analizaron los resultados por estatus mutacional y se encontró que ningún paciente con k-ras mutado tenía una respuesta objetiva. En la actualidad se está estudiando la combinación del anticuerpo en 1ª línea con FOLFIRI o FOLFOX.

RECTO

El abordaje terapéutico del cáncer de recto conlleva ciertas diferencias con el de colon fundamentadas en su situación anatómica. En estadios II y III, al igual que en el colon,

la cirugía es la clave del tratamiento con intención curativa, pero la ausencia de serosa en la porción inferior del recto y la dificultad para obtener márgenes de resección amplios debido a la presencia de la estructura ósea pélvica, compromete la consecución de una resección óptima. A diferencia del cáncer de colon en el que el patrón predominante de fallo son las metástasis a distancia, en los pacientes con cáncer de recto, el primer sitio de recaída tras cirugía se distribuye por igual a nivel local y a distancia. Desde un punto de vista clínico es especialmente preocupante la tasa de recurrencia local la cual oscila entre el 10% y el 45% en el brazo quirúrgico de ensayos multicéntricos randomizados. El riesgo de recurrencia está relacionado con la profundidad de la extensión tumoral en la pared intestinal y la presencia de afectación ganglionar, ascendiendo desde un 5-10% en estadios I a un 30-50% en estadios III. La recaída local influye de manera sustancial en el pronóstico, de manera que la supervivencia a 5 años disminuye de un 85% en pacientes sin recidiva a un 20% en pacientes con recidiva. Por otro lado el desarrollo de una recurrencia local causa una profunda morbilidad con síntomas severos e incapacitantes que comprometen la calidad de vida y son de difícil manejo terapéutico (dolor, perforación, obstrucción, fistulas). Por ello, el objetivo de la estrategia terapéutica del cáncer de recto localizado o localmente avanzado será supervivencia, control local, preservación y función del esfínter y calidad de vida. Con el fin de mejorar el control local se usa tratamiento combinado de quimioterapia y radioterapia con distintas aproximaciones que se detallan a continuación. La cirugía también ha merecido su desarrollo propio con ensayos que comparan distintas técnicas. La enfermedad metastásica sigue los mismos principios que la de colon.

ESTADIOS II Y III, QUIMIORADIOTERAPIA

Con el objetivo de mejorar tanto el control local como la supervivencia diversos grupos cooperativos norteamericanos desarrollaron en la década de los 80 y 90 múltiples ensayos randomizados investigando el papel de la radioterapia y quimioterapia en el tratamiento adyuvante en el cáncer de recto. Las evidencias de algunos de estos estudios quedaron reflejadas en dos conferencias de consenso, una americana (NIH Consensus Conference 1990) y otra alemana (German Cancer Society Consensus

Conference 1998). Las dos coinciden en que la radioterapia y quimioterapia postoperatoria es el tratamiento de elección, fuera de ensayos clínicos, en pacientes con cáncer de recto en estadios II y III.

Los potenciales beneficios de la radiación preoperatoria se aplican a la respuesta del tumor y tejido normal.

1. Reducir el tamaño tumoral puede facilitar la resección y aumentar la probabilidad de una cirugía conservadora de esfínter anal.
2. Además, radiar un tejido sin cirugía previa y por tanto mejor oxigenado puede resultar en mayor sensibilidad a la radioterapia.
3. Se evita radiar intestino delgado que podría quedar adherido tras la manipulación quirúrgica a estructuras pélvicas.

Por otra parte una desventaja de la radioterapia previa es el posible sobretratamiento de tumores de estadios que no requieran radiación adyuvante. Los avances en las técnicas diagnósticas por imagen: ecoendoscopia rectal, escáner TC o RM, pueden minimizar este riesgo⁵⁴.

Los resultados del estudio del grupo sueco que evalúa el uso de radioterapia previa a la cirugía mostraban una ventaja de supervivencia y una tasa de recurrencia menor comparado con cirugía. Sin embargo, el resto de los estudios de RT sola antes o después de cirugía han fallado en demostrar impacto en la supervivencia, aunque sí en mejorar el control local de enfermedad⁵⁵.

La radioterapia disminuye claramente la recurrencia local; sin embargo es la adición de quimioterapia basada en 5-FU la responsable del incremento en un 10-15% en la supervivencia general a 5 años⁵⁶. La estrategia de quimioradioterapia ofrece potenciales ventajas sobre la radioterapia sola, como radiosensibilización y efectos sistémicos en el control de la enfermedad a distancia. En un estudio que comparaban RT sola o RT combinada con 5FU-LV preoperatoria, no se encontró diferencias en la preservación de esfínter ni en SG, pero los pacientes con QT-RT tenían más probabilidad de alcanzar una Respuesta Completa patológica (11.4% vs 3.6%; $p < 0.05$), más toxicidad grado 3-4 (14.6% vs 2.7%; $p < 0.05$) y menos probabilidad de recurrencia

local de la enfermedad (8.1% vs 16.5%; $p<0.05$)⁵⁷. Estas conclusiones se mantenían en la revisión sistematizada que incluía 4 ensayos randomizados⁵⁸.

Asimismo, otro gran ensayo randomizado del Grupo Alemán de Cáncer Rectal, comparó QT-RT preoperatoria con QT-RT adyuvante en pacientes con cáncer rectal estadios II y III. La incidencia acumulada de recaída local a los 5 años fue del 6% con neoadyuvancia y 13% con adyuvancia ($p=0.006$). La incidencia de toxicidades grado 3 y 4 fue superior en el grupo tratado tras la cirugía, 27% vs 40%, $p=0.001$. Asimismo la tasa de toxicidades a largo plazo también fue superior en el grupo de tratamiento postquirúrgico, 14% vs 24%, $p=0.1$. Sin embargo no se encontraron diferencias en la SG a 5 años. Los autores concluyeron que la QT-RT previa a la cirugía ofrecía el mejor control local y menor toxicidad, aunque no aumento en SG⁵⁹.

Otro estudio posterior de la EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) confirmó estos datos. Se estudiaban 4 brazos con 1.011 pacientes T3-T4 resecables:

RT (45Gy-1.8Gy/f)	CIRUGIA	SEGUIMIENTO	
5FU/LV-RT(45Gy-.8Gy/f)	CIRUGIA	SEGUIMIENTO	
RT (45Gy-1.8Gy/f)	CIRUGIA	QT	SEGUIMIENTO
5FU/LV-RT(45Gy-.8Gy/f)	CIRUGIA	QT	SEGUIMIENTO

Este estudio se diseñó asumiendo dos premisas: añadir quimioterapia a la radioterapia previa aumentaría el efecto local de la radioterapia y la quimioterapia antes o después de la cirugía mejoraría la supervivencia global. Pero los resultados no demostraron diferencias en SG, ni en SLE a 5 años, aunque sí en la tasa de recurrencias locales a 5 años: 17% (95% IC, 12.3-21.9) solo RT, 8.7% (95% IC, 4.9-12.6) en el grupo QT-RT previa, 9.6% (95% IC, 5.7- 13.5) para RTpre→QTpost y 7.6% (95% IC, 4.2-11.0) para QT-RT pre→QT post. En un análisis del grupo de pacientes que se sometieron a cirugía completa del tumor, se encontró que en aquellos que resultaron ser ypT0-2 la

quimioterapia adyuvante si aportaba beneficio en SLE y SG. Esto puede indicar que los pacientes se podrían beneficiar de quimioterapia postquirúrgica si la QT-RT previa produce disminución del tumor, “downstaging”. De hecho, evidencias más recientes sugieren que el estadio patológico del espécimen quirúrgico es un indicador de la probabilidad de recurrencia en cáncer rectal localmente avanzado⁶⁰. El ensayo NSABP R3 concluía que la neoadyuvancia (5FU-RT) comparada con la QT-RT adyuvante mejoraba significativamente la SLE. Se consiguieron un 15% de pRC, y ninguno de estos pacientes tuvo recurrencia local⁶¹. Esto es consistente con los estudios de otros autores que sugieren que la tasa de respuestas puede ser un objetivo alternativo para valorar la eficacia de los esquemas nuevos de QT-RT⁶². Dado que se considera por tanto que conseguir una buena tasa de respuestas es importante, se han ensayado esquemas de quimioterapia más complejos en combinación con RT. Los ensayos ACCORD-2 con capecitabina-RT vs capecitabina-oxaliplatino-RT preoperatoria⁶³ y STAR 01⁶⁴, con 5FU-RT vs FOLFOX-RT, no ha demostrado mayor pRC en los brazos con oxaliplatino (13.9% vs 19.2, $p=0.09$; y 16% en ambos brazos del STAR 01) aunque sí mucha más toxicidad grado 3-4.

Con respecto a la forma de administrar 5FU, el estudio del North Central Cancer Treatment Group (NCCTG) demostró que 5FU infusional con RT mejoraba la supervivencia con respecto a 5FU bolus usados tras la cirugía. La mayoría de estos pacientes tenían ganglios positivos. El ensayo posterior del Intergroup 0114 encontraba que el bolus de 5FU con RT no era inferior al bolus de 5FU con LV y RT postcirugía en términos de SLE y SG, pero tenía menor toxicidad hematológica^{65, 66}. Más recientemente, se han comparado capecitabina-RT vs 5FU infusional –RT neoadyuvantes, y los resultados preliminares muestran que la combinación con capecitabina no es inferior en eficacia⁶⁷.

Por tanto el tratamiento estándar del cáncer de recto estadio II o III es quimioradioterapia con 5FU o capecitabina previa a cirugía.

En el estadio IV, la consideración del manejo terapéutico es la misma que para el cáncer de colon propiamente dicho.

FÁRMACOS Y FARMACOGENÉTICA

FARMACOGENÉTICA

Según la definición establecida en consenso por las Agencias Europea (EMA), Americana (FDA) y japonesa del medicamento, la Farmacogenómica (PGx) es la disciplina que se ocupa del estudio de las variaciones en características del ADN y ARN relacionadas con la respuesta a fármacos. La Farmacogenética (PGt) es una rama de la PGx que se ocupa de explicar la variabilidad en la respuesta a los fármacos en relación con variaciones en la secuencia en el DNA de cada individuo.

En los últimos años han cobrado un creciente interés por el avance en las técnicas de secuenciación que suponen mayor rapidez y accesibilidad a los análisis y estudio del genoma, así por el constante interés en mejorar la eficacia y seguridad de los fármacos.

Polimorfismos: son variaciones en la secuencia del ADN que se repiten en más del 1% de la población, y no son patológicas. Genes polimórficos, dan lugar a proteínas polimórficas, como las del grupo sanguíneo ABO. Las variantes alélicas por polimorfismos son indicadas por un asterisco seguido de un número (ej. CYP2D6*1). Normalmente la nominación con *1 es indicativa del alelo tipo puro (wild type) del gen. Se debe diferenciar el polimorfismo de las mutaciones espontáneas que se dan en una frecuencia mucho menor, entre 1×10^{-6} y 1×10^{-8} .

Los **SNPs** (Single Nucleotide Polymorphism) son los polimorfismos en que el cambio sólo afecta a un único nucleótido. Son las variaciones más frecuentes, representan sobre el 90% de todas las variaciones del genoma humano. Se ha estimado una frecuencia de 1 SNP por cada 1.250 pares de bases, lo que supone aproximadamente 1 millón de SNPs que se encuentran por todo el genoma, regiones codificantes y no codificantes. En su mayoría no son responsables de enfermedades, y como se heredan se usan en genética como marcadores. Son los de más utilidad en los estudios de asociación de genes de enfermedades y de la respuesta a fármacos. Una aplicación de este tipo de polimorfismos es que grupos de SNPs vecinos en el mismo cromosoma

pueden tener alelos que muestren patrones diferentes de desequilibrio de ligamiento. Este fenómeno consiste en que la presencia de un alelo en un cromosoma puede sugerir una elevada probabilidad de que otro alelo en particular esté presente en un sitio vecino del mismo cromosoma. Estos alelos relacionados se heredan en bloques llamados haplotipos. Los haplotipos pueden contener un elevado número de SNPs pero pueden ser identificados por unos pocos SNPs usados como marcadores.

Hay otros polimorfismos en que las repeticiones implican a más de 1 nucleótido, hablamos de SSLPs (simple sequence length polymorphisms) que pueden ser STRs (short tandem repeats o microsatélites, repeticiones de 2 nucleótidos) y VNTRs (variable number tandem repeats, número variable de repeticiones)

El conjunto de SNPs que se transmiten juntos con una frecuencia mayor de lo que el azar en el reordenamiento pudiera explicar se conoce como **haplotipo**.

Biomarcador: característica identificable de DNA o RNA que señala un proceso biológico normal, patogénico y/o de respuesta a terapia. Según la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y la Agencia Americana (FDA), en base a la evidencia científica disponible se clasifican en:

- *Válido:* Aceptado por comunidad científica como predictor de resultados clínicos o preclínicos. Sería el caso del gen Her2 para el uso de trastuzumab; el Bcr-Abl para imatinib, dasatinib o nilotinib; K-ras para panitumumab o cetuximab; TMPT para mercaptopurina.
- *Probablemente válido:* Parece tener un valor predictivo pero no está ampliamente aceptado. Ocurre con las mutaciones en el gen EGFR para erlotinib, en CYP2D6 para tamoxifeno, o en UGT1A1*28 para irinotecan.
- *Exploratorios:* son de momento generadores de hipótesis, como el gen del VEGF, ERCC1 y todos los genes reparadores de alquilación para platinos, pGP para taxanos...

En la tabla 3 se muestran biomarcadores incluidos en las fichas técnicas de antineoplásicos por ambas agencias reguladoras.

Tabla 3. Biomarcadores válidos por FDA-EMA en fármacos oncológicos		
Biomarcador	Medicamento	Utilidad clínica del test
c-kit expresión EGFR	imatinib	Predictivo positivo
	erlotinib	en ca pulmón, su expresión se asocia a más respuesta
K-RAS	Cetuximab, panitumumab	Falta respuesta para anticuerpos antiEGFR
HER2	Trastuzumab, lapatinib	Pronóstico negativo, predictivo positivo
TMPT	6-mercaptopurina, tioguanina	Toxicidad hematológica
UGT1A1	irinotecan	Toxicidad hematológica y diarrea.
	nilotinib	Homocigosis: hiperbilirrubinemia
Cromosoma Phi	busulfán	Menos efectivo en LMC Phi -
	Imatinib,	Eficacia en LMC Phi+, selecciona fármacos
	dasatinib, nilotinib	

Los fármacos antineoplásicos interaccionan con nuestro organismo: actúan sobre el tumor, sobre dianas que no son específicas tumorales y también se encuentran en tejido sano, y por otra parte nuestro organismo *actúa* sobre el fármaco a lo largo de toda su ruta metabólica.

Las mutaciones en genes que codifiquen estas proteínas implicadas en el mecanismo de acción o en el metabolismo del fármaco, tendrán repercusiones en la eficacia y toxicidad. Esto resulta especialmente importante por el estrecho margen terapéutico de estos medicamentos, donde una mayor exposición por una eliminación disminuida podría ocasionar una toxicidad intolerable.

Desde el punto de vista de la FGt, consideramos 2 grupos de genes que podrían implicar metodología distinta: los que afectan a la farmacodinamia y a los que afectan a la farmacocinética⁶⁸. El tumor tiene una tasa de crecimiento y replicación muy alta, y por tanto más probabilidades de desarrollar mutaciones, mientras que los polimorfismos en el metabolismo permanecerán a lo largo de la vida. Así que el genotipo del DNA obtenido de muestras sanguíneas, saliva u otra muestra biológica podría no ser el mismo que el del tumor, e incluso puede haber cambios en genotipos

realizados en distintas localizaciones tumorales, primario o metastásico, o en distintos momentos a lo largo de la enfermedad tumoral. De esta manera, estudiar la variabilidad en la toxicidad en relación con polimorfismos de la ruta metabólica del medicamento, su farmacocinética, puede realizarse en sangre o cualquier tejido sano y una única vez al modo de carnet de identidad farmacogenética, puesto que se trata de variantes en línea germinal. Pero para predecir la eficacia de un antineoplásico, su farmacodinamia, puede ser preciso analizar también el tumor, buscar las mutaciones somáticas, o conocer previamente la correlación entre el biomarcador en tumor y en sangre, o el poder predictivo del biomarcador en línea germinal cuando es determinante y su correlación fenotípica está debidamente probada.

EPIGENÉTICA Y MICRORNAS

Otros novedosos mecanismos de regulación de la expresión génica, llamados a convertirse en una rica fuente de nuevos medicamentos y de interesantes descubrimientos en el campo de la farmacogenómica, como los microRNAs y la metilación. La epigenética tiende un nuevo puente que conecta el ambiente y el genoma al explicar la expresión de genes por mecanismos que no están codificados en el ADN. Estos cambios ADN-independientes, debidos a metilación de ADN, modificación de histonas en la cromatina y microRNAs (miRNAs), desempeñan un papel fundamental en los patrones de expresión génica durante el desarrollo y diferenciación normales, pero también juegan su papel en una variedad de respuestas biológicas y en el desarrollo de muchas enfermedades, notablemente del cáncer donde, por ejemplo, es común encontrar hipermetilación en la región del promotor de genes supresores de tumores, asociada con la pérdida de la capacidad de expresión del gen. Por otra parte, muchos genes que codifican enzimas, transportadores, receptores, segundos y terceros mensajeros involucrados con el destino o la acción de fármacos están bajo control epigenético. La farmacoepigénica es un nuevo campo de la ciencia que empieza a encontrar explicaciones a respuestas farmacológicas no explicadas por la farmacogenética clásica. Un ejemplo notable es el gen MGMT, responsable de la reparación de DNA por el daño causado por alquilantes. Se ha

demostrado que la hipermetilación de la región promotora del gen predice respuesta y eficacia a carmustina y temozolamida en el tratamiento del glioblastoma^{69,70}

ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÓMICA

La hipótesis de que las enfermedades comunes deben corresponderse con variantes comunes motivó una ilusión sin precedentes para la búsqueda de estos genes⁷¹, incrementada por el descubrimiento de las variaciones nucleotídicas simples (SNPs) (en un número superior a diez millones) y su catalogación a través del proyecto internacional HapMap (International HapMap Consortium 2005).

Los clásicos estudios de ligamiento son ineficaces para estudiar los genes de enfermedades complejas y para farmacogenética que, como hemos indicado es también un rasgo complejo, y son más eficaces los estudios de asociación, esto es seleccionar un grupo de individuos con un fenotipo (por ejemplo una enfermedad o la respuesta a un fármaco) y otro fenotipo contrario y analizar en ellos un conjunto de SNPs.

Los estudios de asociación se pueden hacer seleccionando SNPs en genes candidatos, o bien, analizando cientos de miles de SNPs de todo el genoma (GWAS, genome wide association study). Ambas aproximaciones son complementarias, pero las segundas están teniendo un éxito particular porque no exigen ideas predefinidas sobre la causa de la enfermedad y en farmacocogenética. Estos estudios de asociación han mejorado notablemente desde que sabemos que definir bien el fenotipo es esencial, que los aspectos genético-poblacionales son importantes y, sobre todo, que es importante realizar correcciones estadísticas apropiadas para evitar falsos positivos. Desde hace pocos años, y gracias a todo lo anteriormente explicado, se están encontrando SNPs y con ellos genes o regiones génicas asociados a muchas enfermedades comunes de todo tipo. De momento, sólo se ha conseguido explicar una pequeña parte del componente genético, y no pueden ser utilizadas para predecir el riesgo de una enfermedad común en un individuo, pero en algunos casos ya permitirían orientar políticas sanitarias, y en casi todos los casos, están permitiendo encontrar nuevos

genes y rutas, lo que nos está posibilitando entenderlas mejor -en algunos casos como en la esquizofrenia supone un importante cambio en el paradigma de la enfermedad - y en el futuro próximo nos permitirá subclasificarlas mejor, y tratarlas mejor, pues la farmacogenética (esto es el desarrollo de test de ADN que nos permitan valorar la respuesta a un fármaco) está siendo uno de los campos más directamente beneficiado.

FÁRMACOS Y SUS BIOMARCADORES FARMACOGENÉTICOS

5-FLUOROURACILO (5-FU)

El 5-Fluorouracilo es una fluoropirimidina “antimetabolito”, análogo de un sustrato metabólico natural de la célula, consolidado como agente antitumoral desde hace más de 40 años. Tanto las células normales como las tumorales metabolizan 5-FU a su derivado monofosforilado, FdUMP, y trifosforilado, FUTP, conocido por sus efectos citotóxicos⁷². En la ruta metabólica del 5-FU (Fig 6), las reacciones anabólicas y catabólicas engloban diversas enzimas, la actividad citotóxica del 5-FU depende de su anabolismo, que ejerce sus efectos a través de la inhibición de la actividad de la timidilato sintasa o la incorporación a RNA y/o DNA, por catabolismo del 5-FU éste es enzimáticamente inactivo reduciéndose el anillo de pirimidina a 5,6-dihidrofluoracilo por el enzima dihidropirimidina (DPYD). Se ha demostrado que aproximadamente el 85% del 5-FU administrado se degrada a través de la ruta metabólica en el hígado y en tejidos extrahepáticos, mientras que, un 10% se excreta a través del riñón.

La capecitabina es un profármaco del 5-FU que se transforma a través de carboxilesterasas presentes en plasma, hígado y tumor en 5-FU. Esto favorece una ventajosa teórica concentración del fármaco en el tumor.

Tiene dos vías principales de acción a través de sus metabolitos activos 5-fluoro-2'deoxiuridina- 5' monofosfato (**FdUMP**) y 5-fluoroUTP (**5-FUTP**). Cuando es administrado por vía oral o por bolo, actúa a través del metabolito 5-FUTP, que se incorpora al ARNm intracelular, lo que conlleva su disfunción e inhibición de la síntesis de proteínas⁷³.

La segunda vía de actuación del 5-FU es cuando es administrado por infusión continua, a través de su otro metabolito activo, FdUMP, que es un inhibidor de la Timidilato Sintetasa. Una de las consecuencias de esta vía es la disminución de los niveles de metilación celulares y síntesis de Timidina. Este metabolito también puede ser

fosforilado a FdUTP e incorporado directamente al ADN. Esta incorporación errónea inhibe la elongación de la cadena y altera su estabilidad, lo que resulta en la producción de roturas de una hebra y fragmentación del ADN^{74,75}.

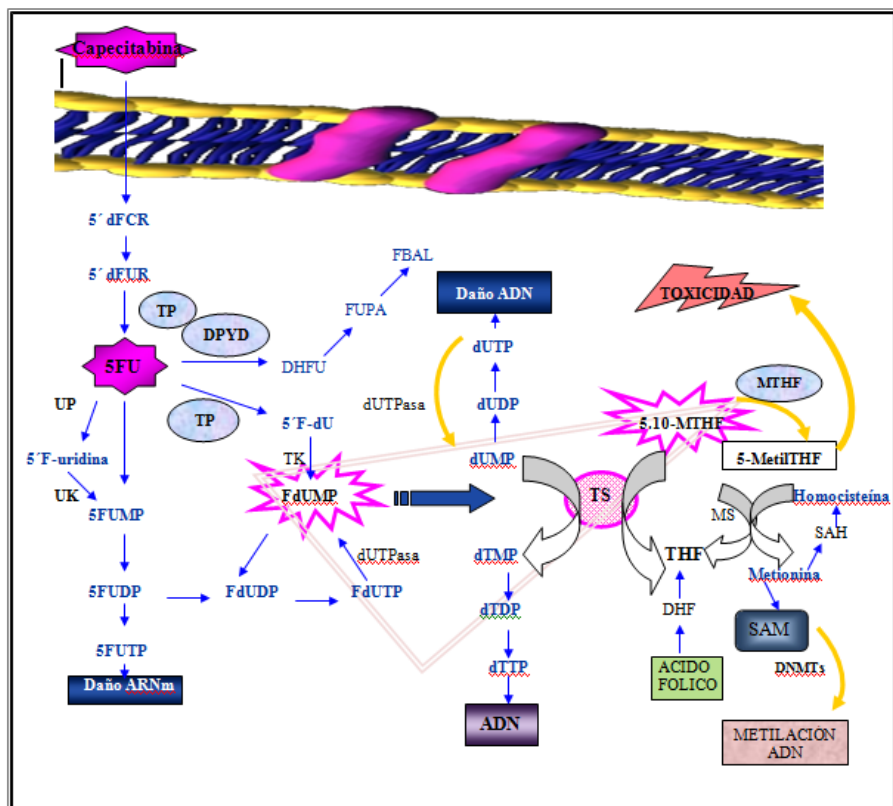


Figura 6: Rutas metabólicas de 5-FU, funciones de TS, MTHFR Y DPYD

La **Timidilato Sintasa (TS)**, codificada por un gen que tiene su locus en el cromosoma 18p, es una enzima dimérica citosólica que cataliza la metilación reductiva de deoxiuridina-5´monofosfato (dUMP) a deoxitimidina-5´monofosfato (dTMP). En esta reacción, un grupo metilo del cofactor 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-MTHF) se transfiere a la posición 5 del anillo de la pirimidina, procurando la única fuente de novo de dTMP (timidina), nucleótido necesario para la síntesis de ADN. Por tanto, es una

enzima limitante en la ruta de síntesis de novo del ADN y una atractiva diana para moléculas de inhibición. En los últimos 40 años se han desarrollado múltiples fármacos que inhiben esta enzima o su sustrato (dUMP) ensamblándose en el lugar de unión del cofactor (folato). El FdUMP compite con el dUMP y, en presencia de los niveles adecuados de poliglutamatos de cadena larga de 5,10-MTHF, atrapa a la enzima TS en un complejo ternario. El bloqueo de TS provoca una depleción de dTMP y, por tanto, de dTTP y una acumulación de dUMP que es incorporado al ADN produciendo errores, rotura de hebras y, finalmente, muerte celular. En esas condiciones, el FdUTP también puede ser incorporado erróneamente al ADN⁷⁶.

Polimorfismos en el gen que codifica para la TS también han demostrado influir en la respuesta al tratamiento con 5FU, varios estudios han demostrado que tanto el mRNA TS como los niveles de proteína están inversamente relacionados con la respuesta antitumoral (para niveles elevados de TS tanto su RNAm como el enzima resultante de la traducción responsable de una de las reacciones intermedias que darán lugar a la síntesis del DNA, estarán relacionados con un peor pronóstico de la enfermedad y con peor respuesta al tratamiento) así como a la supervivencia en pacientes con CCR avanzado siendo inferior si la expresión de la TS es elevada.

Se han descrito, en el *enhancer* de la region promotora de la TS (**TSER**), diversos polimorfismos diferentes, pero dos de ellos son los más frecuentes. El primero es un polimorfismo VNTR que consiste en dos o tres repeticiones (**TSER*2 o TSER*3**) en tandem de una secuencia de 28 pares de bases en la región 5' del promotor del gen (TSER). Se ha visto que a medida que aumenta el número de repeticiones aumentan los niveles de TS mRNA y la expresión de la proteína, por lo tanto, pacientes homocigotos para TSER*3 tendrían mayor actividad TS, peor pronóstico y una peor respuesta al tratamiento con 5FU que pacientes homocigotos para TSER*2.

El otro polimorfismo es un SNP común en el décimo segundo nucleótido de la segunda repetición en el alelo 3R, que consiste en una transversión del nucleótido C por G y se asocia con un nivel de expresión de TS 2.6 veces superior al del alelo 2R, tanto in vitro como en el tumor⁷⁷. Los pacientes homocigotos para la triple repetición (3R/3R) presentan un nivel de actividad enzimática de TS de 2 a 4 veces mayor que los

pacientes homocigotos para la doble repetición (2R/2R). Se ha demostrado que el alelo 3G se asocia con los niveles más elevados de expresión de esta enzima aunque otros autores han comprobado que los genotipos portadores de este alelo responden peor a la quimioterapia basada en 5-FU que los que no lo tienen⁷⁸.

Por otro lado, en la posición 1494 de la región **3'UTR** de este mismo gen, existe una variación de 6 pares de bases, que consiste en una delección de este pequeño fragmento. Parece ser que la variante 6pb también puede estar relacionada con los niveles de expresión de la enzima TS y con los dos polimorfismos encontrados en el promotor⁷⁹, 3'UTR modula la regulación del gen a nivel postranscripcional a través del control de la estabilidad del ARNm. El polimorfismo -6pb se asocia con una reducción en la estabilidad del ARNm in vitro y una expresión reducida de la proteína TS en el tejido tumoral en CCR⁸⁰.

Más del 80% del 5-FU es inactivado en el hígado por la enzima DPD y su actividad varía entre 5-21 veces⁸¹. Se han descrito mejores respuestas en aquellos pacientes con cáncer colorrectal cuyos tumores presentan baja expresión de la enzima DPD. Por otro lado, los pacientes con una baja actividad de la DPD no consiguen inactivar adecuadamente el 5-FU y se forman excesivas cantidades de metabolitos activos provocando elevada toxicidad que puede llegar a ser mortal. Se ha comprobado que los individuos que padecen toxicidad severa frente al 5-FU presentan una reducida actividad de la enzima DPD (por debajo de 100pmol/min/mg de proteína en células de sangre periférica). Aproximadamente el 3% de la población son portadoras de mutaciones heterocigotas que inactivan la DPD y el 0,1% son homocigotos para estas mutaciones. La deficiencia completa de esta enzima provoca un metabolismo deficiente de las pirimidinas que se asocia con desordenes neurológicos. Se han documentado al menos 350 casos de asociación entre deficiencia en la enzima DPD y toxicidad severa a 5-FU y en siete de ellos los pacientes han fallecido⁸². Una transición de G a A en la región 5' de la secuencia consenso de splicing del exón 14 ocurre en el 50% de los individuos que presentan un alelo no funcional de la proteína DPD, provocando una delección del exón 14 y por lo tanto la generación de una proteína truncada que es degradada por el proteosoma. Esta variante recibe el nombre de

*DPYD*2A*. Un estudio realizado en 25 pacientes con toxicidad en grado III-IV demostró que el 24% de los pacientes eran portadores de esta mutación. Si bien esta mutación parece ser la más frecuente, hasta ahora se han descrito un total de 20 mutaciones que se asocian con una reducida actividad de la enzima DPD y por tanto quizás en un futuro sea necesario realizar un screening completo de todo el gen. Por otro lado, otros trabajos demuestran que aproximadamente entre un 33-66% de pacientes con toxicidad severa tras el tratamiento con el 5-FU presentan un fenotipo normal en la enzima DPD lo que sugiere que además de esta enzima existen otros factores que determinan la toxicidad a esta droga.

El análisis de expresión de mRNA de las enzimas DPD y TP en combinación con el análisis de expresión de la enzima TS sugieren que estas tres enzimas podrían actuar como factores predictivos independientes de resistencia a 5-FU en cáncer colorrectal metastásico. Aunque estas enzimas, TS, DPD y TP son las que por el momento han aportado resultados más favorables como marcadores de resistencia al 5-FU, se están investigando otros muchos genes.

El anabolismo del 5-FU es bastante complejo, con varias reacciones paralelas, idénticas a las vías de novo seguidas por el uracilo. El 5-FU puede seguir tres vías diferentes interconectadas entre ellas:

1. una de ellas está catalizada inicialmente por la timidina fosforilasa (TP) dando lugar a la 5-fluoro-2'-deoxiuridina (Fdurd).
2. una segunda vía da lugar a la 5-fluorouridina (Furd) mediante el enzima Uridina Fosforilasa que mediante una Uridina Quinasa da lugar a 5-fluorouridina-5'-monofosfato (FUMP)
3. una tercera vía catalizada por el Ornato Fosforibosil Transferasa (OPRT) que también da lugar al FUMP con uso preferencial de esta vía y relacionándose con una sensibilidad mayor a 5-FU en líneas celulares de cáncer.

Por lo tanto, las vías 2 y 3 desembocan en la formación de una molécula común FUMP y a partir de aquí siguen una vía común.

La **Timidina Fosforilasa (TP)**, también denominada factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas, cataliza la interconversión de timina a timidina utilizando la

desoxiribosa-1-fosfato (dR-1P) y fosfato inorgánico (Pi) como segundos sustratos y por otra parte cataliza la reacción de transferencia de un grupo desoxiribosilo de un nucleótido a otro. Una elevada expresión intratumoral de TP ha sido asociada frecuentemente con una falta de respuesta a quimioterapia del 5-FU. La correlación inversa entre la respuesta quimioterapéutica al 5-FU y la expresión de TP se debe probablemente a dos causas:

- TP es importante en la angiogénesis y lo que sugiere es que un aumento en su expresión es un marcador de otros cambios genéticos asociados al desarrollo de un fenotipo tumoral más agresivo. Este fenotipo contribuye a la resistencia a agentes citotóxicos como el 5-FU a través de la pérdida del potencial apoptótico.
- La actividad enzimática de TP es reversible y además puede deglicosilar FdU. Dada la actividad de deglicosilación de TP y su elevada expresión en tumores agresivos, se ha probado con el uso de profármacos para llevar el 5-FU específicamente a las células del tumor. Los profármacos capecitabina y tegafur son dos ejemplos de profármacos disponibles oralmente y que requieren de la TP para su actividad.

Algunos autores han comprobado que los niveles de Timidina Fosforilasa suelen estar más elevados en el tejido tumoral que en el tejido normal adyacente. Cuando se administra 5-FU, el FdUMP es anabolizado por la TP presente en el tumor, que también puede transformar metabolitos derivados del 5-FU en 5-FU. Por tanto, la expresión de TP puede afectar a la sensibilidad a 5-FU; estudios anteriores han determinado que su ADNc puede transfectarse a células tumorales haciéndolas sensibles al tratamiento.

El gen que codifica **MTHFR** está localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (locus 36.3). MTHFR es una enzima clave en la homeostasis y en la regulación del folato intracelular, compuesto esencial para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Su papel principal es catalizar la transformación de 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-MTHF) a 5-metilentetrahidrofolato (5-MTHF), este último sirve como un donante de grupos metilo necesario para la conversión de homocisteína en metionina y

subsecuente producción de S-Adenosilmetionina (SAM). SAM es el donador universal de grupos metilo en humanos y es necesario para múltiples reacciones de metilación en la célula, entre ella la metilación del ADN. La metilación de homocisteína es catalizada por la enzima Metionina Sintasa (MS), que requiere el cofactor vitamina B12.

La variante C677T, que implica la sustitución de alanina por valina, ha sido asociada con una disminución de la actividad de MTHFR, con un incremento de los niveles de homocisteína y una alteración en la distribución del folato. La detección de este polimorfismo puede ser útil para identificar a los pacientes con riesgo alto de presentar toxicidad durante el tratamiento con metotrexato. En este sentido, se ha observado que los pacientes homocigotos para el alelo mutante TT o los heterocigotos CT (aproximadamente el 10 y el 40% de la población, respectivamente) presentan un mayor riesgo de efectos adversos tras el tratamiento con metotrexato que los pacientes con genotipo salvaje CC. Por otra parte, se ha observado que el genotipo MTHFR también influye en la respuesta del cáncer de mama y del colorrectal a la quimioterapia con 5-FU. Así, los pacientes con genotipo mutante TT respondieron mejor que los heterocigotos o con genotipo salvaje⁸³. El genotipo 677TT también ha sido asociado con un tiempo significativamente mayor de la progresión, 75 aunque no tiene efectos relevantes en la supervivencia global⁸⁴. La combinación de la variante genética *MTHFR* C677T con la actividad o polimorfismo de la *TS*, parece tener un mayor poder predictivo sobre la respuesta a la quimioterapia basada en 5-FU en comparación con la que tiene el polimorfismo C677T sólo⁸⁵. Sólo unos pocos estudios han analizado el papel de la variante C677T sobre los efectos secundarios de la terapia basada en fluoropirimidinas en CCR, pero por el contrario, el genotipo 1298CC en un estudio de una población con CCR avanzado se ha correlacionado con un mayor riesgo de desarrollar reacciones adversas graves después de quimioterapia basada en 5-FU. El genotipo 1298CC también se ha asociado con una menor supervivencia y un reciente trabajo de Zhang y col. han sugerido, por primera vez, la hipótesis de que los polimorfismos MTHFR pueden estar asociados con respuesta clínica según el sexo, en particular, los autores han reportado una correlación significativa entre genotipo 1298AA y una mayor supervivencia global en mujeres, pero no para los pacientes

varones con colorrectal avanzado cáncer con esquemas basados en 5-FU, sin embargo, son necesarios más estudios para validar estos resultados. Terrazzino y col. han llevado a cabo un análisis de los haplotipos C677T/A1298C en pacientes con cáncer rectal tratados con radioterapia preoperatoria y 5-FU y encontraron que la variante *MTHFR 677T-1298A* predispone a una peor respuesta y a una más baja tasa de regresión tumoral en comparación con otras combinaciones de genotipo. Por otra parte diferencias en el escenario clínico (neoadyuvancia, adyuvancia, primera/segunda línea metastásica) y en la administración de 5-FU (bolo y perfusión) podrían afectar en las asociaciones entre los polimorfismos de *MTHFR* y la actividad de las fluoropirimidinas. Otras cuestiones a considerar son las diferencias de raza y origen étnico de los pacientes además de la variabilidad individual de los niveles de folato.

OXALIPLATINO

El Oxaliplatino (1,2-diamino clicoexano-oxalato-platino) es un derivado platinado de tercera generación que fue aprobado por la FDA para su uso en cáncer colorrectal metastático⁸⁶ en 2002 y por EMA en 1995. El oxaliplatino muestra un comportamiento químico y un mecanismo de acción similar a otros derivados del platino con mayor efectividad y menor nefrotoxicidad. Ha mostrado actividad en tumores con resistencia intrínseca o adquirida al cisplatino. Este hecho está relacionado con la diferente estructura de los enlaces o “aductos” que forma el oxaliplatino y que le permiten obviar ciertos mecanismos de resistencia a otros agentes platinados. Especialmente el que resulta de la reparación de los defectos en la replicación del ADN

Aunque el mecanismo preciso no es del todo claro, los agentes derivados del platino ejercen su citotoxicidad de forma similar a los agentes alquilantes. Producen enlaces intrahebra o entre las dos hebras del ADN (conocidos como aductos), sobre todo en islas CpG (regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos) (Fig7).

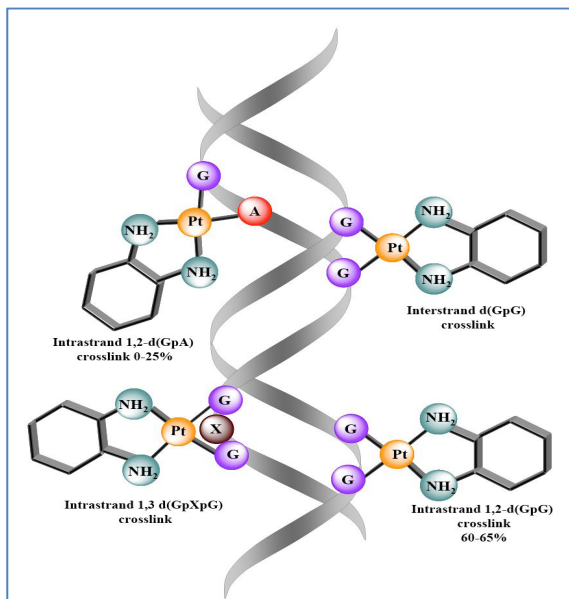


Figura 7: formación de aductos por oxaliplatino

Estos enlaces resultan en la formación de uniones covalentes entre el complejo activo platinado y determinadas bases de la secuencia del ADN, lo que lleva, en último término, a la apoptosis. De hecho, el grado de citotoxicidad que ejercen este tipo de compuestos, se correlaciona con la unión al ADN, concretamente, las lesiones citotóxicas provocadas por el Oxaliplatino ocurren mayoritariamente por las uniones intracatenarias con dos guaninas adyacentes o próximas de forma similar a las que realiza el cisplatino. Otros aductos incluyen enlaces intracatenarios entre dos bases guanina-adenina adyacentes y enlaces entre guaninas de hebras opuestas del ADN. No obstante, estas uniones representan menos de un 5% del total de aductos generados. El oxaliplatino forma protuberancias en el ADN más citotóxicas que las formadas por otros fármacos derivados del platino. Por tanto, es más efectivo en el bloqueo de la replicación. Los enlaces que el platino forma con el ADN causan la inhibición de la síntesis del mismo, interfieren en los procesos de transcripción e inhiben la reparación, activan las vías de transducción de señales que desencadenan la apoptosis y

finalmente la muerte celular. Este hecho, además, parece ser independiente de la fase del ciclo celular en que se encuentre la célula.

A pesar de las similitudes obvias en el tipo de lesiones que provocan, existen diferencias estructurales significativas tanto en el tipo como en la frecuencia de lesiones que ocasionan oxaliplatino y otros derivados del platino. A concentraciones equimolares, Oxaliplatino genera un menor número de aductos ADN-platino pero presenta una toxicidad similar a los otros compuestos⁸⁷. Además, las uniones que se generan ocurren mucho más rápido (15 minutos en el caso del oxaliplatino versus 12 horas para Cisplatino). Los cruzamientos intrahebra provocan la transcripción de genes supresores de tumores, como *p53*, que llevan a la célula a apoptosis mediada por la activación de cascadas de quinasas.

Existen múltiples mecanismos de resistencia de las células cancerosas relacionados con agentes de platinos, entre los que destacamos^{88,89}:

- Descenso en la acumulación de la molécula.
- Inactivación del fármaco por niveles incrementados de glutatión (conjugación) o de metalotioneína (secuestro)
- Defectos en el sistema de reparación por excisión de bases.
- Incremento en el sistema de reparación por excisión de nucleótidos de los aductos del ADN.

Defectos en el sistema de reparación del ADN (Mismatch Repair System) e incremento en el bypass replicativo han sido reportados como mecanismos de resistencia a cisplatino o carboplatino pero no parecen contribuir a la resistencia a oxaliplatino.

GSTP1 (*glutathión S-transferasa*)

El glutathión S-transferasa (GST) son una familia multigénica de enzimas (citoplasmática y de membrana), que catalizan la conjugación de glutathión a los xenobióticos electrofílicos para inactivarlos y facilitar su excreción del cuerpo⁹¹. GSTs desempeñan un papel importante en el metabolismo de los compuestos potencialmente genotóxicos mediante la prevención de daños en el ADN por formación de aductos.

La isoenzima GSTP1 participa en la desintoxicación de los derivados del platino, sobre todo cisplatino, y resulta ser un importante mediador de la resistencia intrínseca y adquirida al platino. Además de GSTP1, la actividad de GSTM1 y GSTT1 podrían estar involucrados en la respuesta al tratamiento⁹², sin embargo, el papel de estas enzimas específicamente en la vía de oxaliplatino sigue siendo desconocido. Las variaciones genéticas del GST se han asociado con cambios en la actividad enzimática. Cuatro polimorfismos frecuentes en los genes *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1* pueden disminuir o suprimir la actividad de la enzima GST. **GSTP1** es un gen polimórfico situado en el cromosoma 11 con dos sustituciones de un solo nucleótido en el exón 5 (A313G) y el exón 6 (C341T) que dan lugar a **Ile105Val** y **Ala114Val**, respectivamente⁹³.

Estas sustituciones de aminoácidos parecen estar dentro de los sitios activos de la GSTP1 y dan lugar a la alteración de la afinidad del sustrato.

Entre los polimorfismos con supuesta influencia sobre la desintoxicación de oxaliplatino (GSTP1, GSTM1 y GSTT1), Stoehlmacher y cols. comprobaron una asociación entre las variantes GSTP-105 y la supervivencia de los pacientes con CCR metastásico tratados con quimioterapia con FU/oxaliplatino de segunda y tercera línea. En el presente estudio, ninguna de las variantes GSTP1, GSTM1 y GSTT1 mostró una asociación con eficacia, aunque el alelo GSTP1-105 G fue un factor genético desfavorable en lo que se refiere a la aparición de neurotoxicidad por oxaliplatino.

Las protuberancias creadas en el ADN por los fármacos derivados del platino son reparadas principalmente por los sistemas de reparación por excisión de nucleótidos NER (Nucleotide Excision Repair) (Fig 9). Por ello, mutaciones o polimorfismos en los

genes implicados en estos sistemas pueden asociarse con una disminución en la capacidad de reparación y conllevar a un aumento en el riesgo de cáncer, además de una sensibilidad mayor a la radiación ultravioleta o ionizante y a los agentes alquilantes. Se ha demostrado que *ERCC1* y *XPB* (también llamado *ERCC2*), y por otro lado *XRCC1*, desempeñan papeles clave en la vía de reparación por escisión de nucleótidos NER y reparación por escisión de bases BER respectivamente⁹⁴.

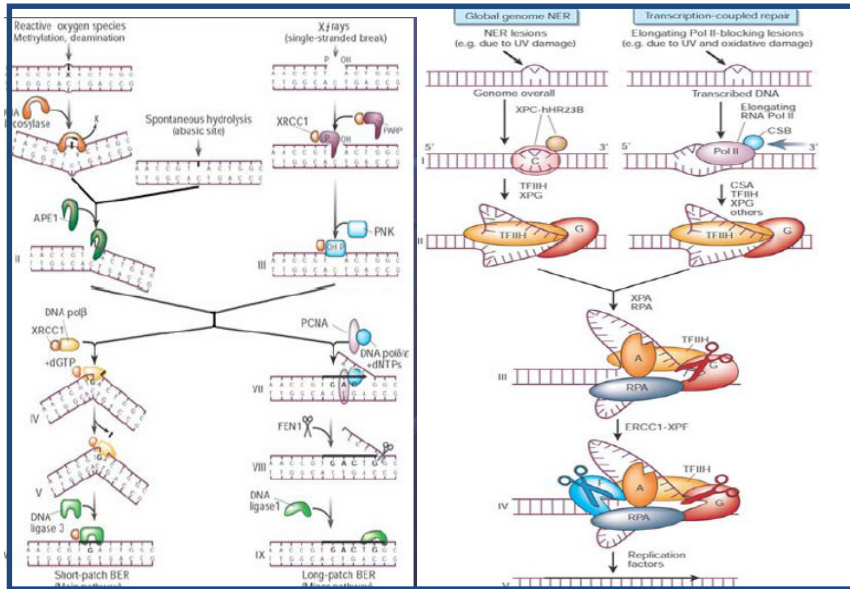


Fig 9: (A) Ruta de reparación del ADN por escisión de Bases. Se muestra un modelo general de parche corto (izquierda) y parche largo (derecha) de las rutas BER. La reparación de parche corto (80-90% del total de BER) reemplaza la lesión con un solo nucleótido. La reparación de parche largo reemplaza la lesión con aproximadamente 2-10 nucleótidos. **(B)** Ruta de reparación del ADN por escisión de nucleótidos (NER). Se muestra un modelo simplificado de los pasos de la ruta NER. Hay dos formas distintas de NER: NER genómico global (GG-NER), que corrige el daño en zonas del genoma transcripcionalmente silenciadas, y NER acoplada a transcripción (TC-NER), que repara 7 lesiones en la hebra transcripcionalmente activa del ADN. Las dos subrutinas son idénticas excepto en cuanto al mecanismo de reconocimiento de daño al ADN.

ERCC1 (*Excision Repair Cross Complementation 1*)

La reparación del ADN es un mecanismo importante para la resistencia a la terapia basada en platino y, posiblemente, en el desarrollo de neurotoxicidad. La resistencia a oxaliplatino se ha atribuido a un incremento de la tolerancia y reparación de la lesión del ADN por la vía de reparación de escisiones de nucleótidos (NER). Este sistema de reparación se encarga de reparar lesiones voluminosas en los genes transcritos. El proceso de reparación se lleva a cabo mediante la formación de complejos multiproteicos que reconocen, escinden y reparan la lesión. La sobreexpresión del gen ERCC1 (*Excision Repair Cross Complementation 1*) confiere a la célula tumoral una mayor capacidad reparadora frente a las lesiones generadas por el platino impidiendo la acción citotóxica del fármaco.

En modelos experimentales, la variante alélica ERCC1-118 T mostró posibles consecuencias funcionales, con tendencia a unas mayores concentraciones de ARNm de ERCC1 que las observadas en presencia del alelo ERCC1- 118 C⁹⁵. Hasta ahora, en dos estudios se ha abordado el análisis del polimorfismo ERCC1-118 C/T en pacientes con CCR avanzado tratados con quimioterapia basada en oxaliplatino y ambos han revelado un efecto adverso del alelo ERCC1-118 T⁹⁶.

XPD (*xeroderma pigmentosum*)

XPD es una helicasa 5'- 3' que relaja el ADN durante la reparación por escisión de nucleótidos. El Xeroderma pigmentoso tipo D es una proteína requerida para la reparación por escisión de nucleótidos (TNM). Este producto reconoce y repara una amplia gama estructuralmente de las lesiones no relacionadas como aductos voluminosos causado por la luz ultravioleta, agentes ambientales y el daño oxidativo consecuencia de un defecto en la vía⁹⁷ de reparación NER de ADN dañado por UV.

Los polimorfismos de XPD pueden actuar como factores de susceptibilidad genética. Como estudio preliminar de funcionalidad, se analizó la asociación de dos polimorfismos localizados en los codones 199 (Ile/Met) y 751 (Lys/Gln) con la

capacidad de reparar roturas en las cromátidas y el resultado fue una reparación subóptima en aquellas células portadoras de alelos mutados⁹⁸.

XRCC1 (Nucleotide Excision Repair Cross Complementing)

XRCC1 es una proteína fundamental en la ruta de reparación por escisión de bases (BER), que repara la base dañada y las rupturas de una sola hebra en el ADN causadas por radiaciones ionizantes y agentes alquilantes. Forma un complejo reparador multiproteico integrado por proteínas que reconocen los puntos de rotura que está físicamente asociado con la ADN ligasa III en su extremo C-terminal⁹⁹. Teniendo en cuenta que el producto génico de XRCC1 recambia bases dañadas por oxidación, metilación, reducción o fragmentación, aquellas células con un gen XRCC1 mutante serán más sensibles a radiación UV, radiación ionizante y agentes alquilantes. Los dos polimorfismos más importantes identificados hasta ahora llevan a una sustitución de aminoácidos en regiones del gen muy conservadas evolutivamente: en el codon 194 del exon 6, debido a un cambio de bases pirimidínicas C por T (Arg/Trp) y en el codon 399 del exon 10, debido a un cambio de bases púricas G por A (Arg/Gln) confiriendo una menor actividad a la proteína afectando a la capacidad del sistema BER para reparar las lesiones inducidas en el ADN por el oxaliplatino evitando la correcta señalización de muerte celular por apoptosis.

La presencia del polimorfismo en el exon 10 se ha correlacionado clínicamente con la resistencia al tratamiento con oxaliplatino.

Stoehlmacher y col. mostraron que la presencia del polimorfismo en uno de los alelos o en ambos (genotipo Gln/Arg o Gln/Gln) afecta a la respuesta al tratamiento basado en oxaliplatino en pacientes con CCR metastático y a la supervivencia, 5.5 meses respecto a los 11.2 de los pacientes con el genotipo Arg/Arg.

IRINOTECAN

Irinotecan es un inhibidor de la topoisomera I que interrumpe la replicación del DNA en células cancerígenas y como resultado muerte celular. Mediante una carboxilesterasa, se transforma en su metabolito activo, que se excreta por la bilis y tiene circulación enterohepática. Se inactiva por glucoronidación mediante la acción de la UGT1A1, dando el derivado más hidrosoluble SN-38G.

La variación genética de UGT1A1 ha sido ampliamente estudiada en relación con síndromes de hiperbilirrubinemia, puesto que cataliza la glucuronidación de la bilirrubina. La eficiencia trasncripcional genética ha sido inversamente correlacionada con el número de repeticiones TA en la región promotora del gen. Se ha descrito también un polimorfismo en la zona promotora, la región llamada TATA *box* del gen de *UGT1A1*. Este polimorfismo consiste en una variación en el número de repeticiones del dinucleótido TA que varía de 5 a 8. En la población caucásica se limitan a 6 ó 7, y la forma normal es la homocigota para 6 repeticiones (6/6) que se designa como *UGT1A1**1. La homocigosis para 7 repeticiones se ha asociado con síndrome de Gilbert, que se caracteriza por una deficiente glucuronidación de la bilirrubina. A causa de la importancia de esta ruta metabólica en el metabolismo de irinotecan, se escogió UGT1A1 como gen candidato que podría explicar la toxicidad grave del medicamento. Basándose en estudios funcionales se ha demostrado que la actividad del gen es inversamente proporcional al número de repeticiones. La presencia de 7 repeticiones en uno de los dos alelos se asocia a una disminución de la actividad de *UGT1A1* y esta variante es designada como *UGT1A1**28 (Fig 10). En este caso, debido al pequeño número de repeticiones, las diferentes formas del gen no pueden separarse por electroforesis y es necesaria la secuenciación para determinar el tipo de polimorfismo.

La frecuencia en la población española es del 43% de homocigotos para 6 repeticiones (6/6), del 49% para los heterocigotos y de sólo el 8% para homocigotos con 7 repeticiones (7/7). La relación de este polimorfismo con la farmacocinética del fármaco y del SN-38 está bien establecida: pacientes con el genotipo 7/7 tienden a tener mayor área bajo la curva plasma tiempo-concentración (AUC) de SN-38 y menores ratios de

SN-38G/ SN-38. Esto se ha comprobado en pacientes adultos y pediátricos, con distintas dosis, en distintos tumores y en orígenes asiáticos o europeos^{100 101 102 103 104}.

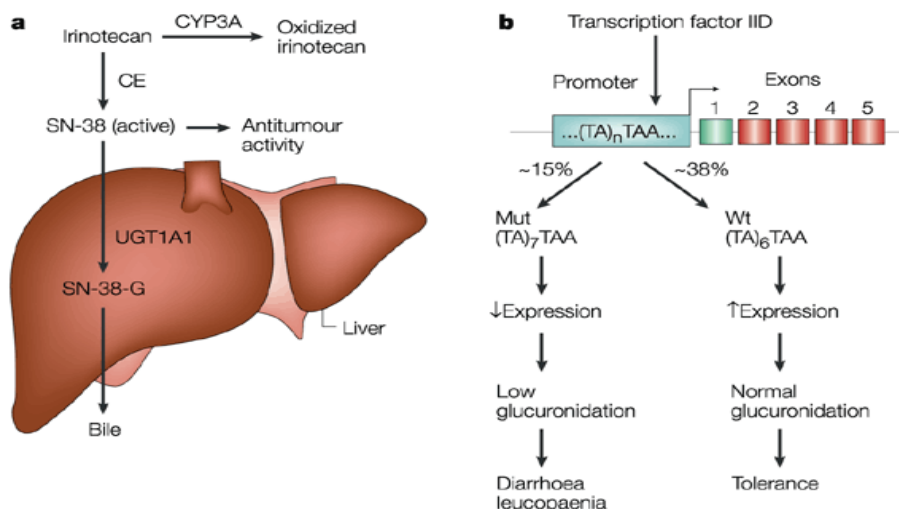


Figura 10: UGT1A1*1 Y UGT1A1*28, función sobre SN-38

La relación con toxicidad en pacientes tratados con irinotecan se ha demostrado en varios trabajos. El primero que marcó el inicio de la llamada “irinogenomics”, firmado por Innocenti en el 2004, estableció una fuerte asociación entre neutropenia grado 4 y genotipo 7/7, con un riesgo relativo de 9.3 (95% CI, 2.4 a 36.4). En una revisión sistemática de la evidencia sobre la relación entre toxicidad y genotipado de irinotecan, la tasa global de neutropenia grado 3-4 de los 8 estudios escogidos para el análisis fue del 16% (95% CI 13–19%). Al estratificar por genotipo, las tasas eran 9.8% (6.8–14%) para *1/*1, 18% (14–23%) para *1/*28, y 38% (22–57%) para los pacientes con UGT1A1 *28 / *28¹⁰⁵. Los riesgos relativos (RRs) fueron 1.82 (95% CI 1.16 –2.85) para pacientes heterocigotos *28 y 3.51 (95% CI 2.03– 6.07) para homocigotos *28 / *28.

Otros autores también encontraron una correlación con diarrea grave¹⁰⁶. Sin embargo, no todos los trabajos con asociación con toxicidad hematológica, confirmaron la asociación con diarrea¹⁰⁷. En la revisión sistemática citada anteriormente, la tasa global de diarrea grado 3 ó 4 es entre 19-30 %. En los 6 estudios en los que se encontró una asociación positiva, las tasas de diarrea son significativamente diferentes

cuando se estratifican por genotipos: 18% (95% CI 11–28%) para 1/*1, 27% (95% CI 20–36%) para heterocigotos 1/28, y 27% (95% CI 12–48%) para homocigotos *28/*28. Estas controversias en la reproductibilidad de los resultados han limitado la aplicación clínica del test farmacogenético de *UGT1A1*. Como resultado de la revisión sistemática anterior, la sensibilidad clínica para neutropenia grave sería del 23 % (15-34%), y la especificidad clínica 92% (90-94%), definidas sensibilidad como el porcentaje de pacientes con neutropenia grave y homocigotos para *28, y especificidad como porcentaje de individuos sin neutropenia grave que no eran homocigotos para *28. Hay razones que justifican estas diferencias en los resultados comparados entre estudios:

- Las dosis de irinotecan utilizadas son distintas (desde 15 mg/m² /día por 5 días cada 2 semanas en niños hasta 350 mg/m² cada 3 semanas)
- Los esquemas son distintos en su composición, solo irinotecan o combinaciones con otros citostáticos que solaparían sus toxicidades (con 5-FU)
- Los estudios farmacogenéticos se han hecho sobre pacientes con patologías distintas: cancer colorectal, pero también tumores del sistema nerviosos central, pacientes adultos y pediátricos.
- En unos estudios la toxicidad estudiada fue la presentada tras el primer ciclo de irinotecan en otros la más alta presentada durante todo el tratamiento.
- La neutropenia se mide en el nadir y otras en el día que estaba previsto administrar el siguiente ciclo, como es habitual en la clínica asistencial.
- En todo caso se conoce el RR para neutropenia, pero no para neutropenia febril.
- Los trabajos que incluyen diferentes etnias no estratifican los resultados.
- Las muestras son pequeñas.
- No se ha estudiado suficientemente la influencia de otras variantes del gen *UGT1A1*.

Recientemente se han comunicado las contribuciones de otras variantes a la toxicidad.

Concretamente Cechin y colaboradores analizaron UGT1A1*28, UGT1A1*60, UGT1A1*93, UGT1A7*3, y UGT1A9*22 en 250 pacientes con CCR. Dos de ellos, UGT1A1*93 (3156G-A) y UGT1A1*60 (3279T-G), aparecen con frecuencia en desequilibrio de ligamiento con UGT1A1*28, en población blanca. UGT1A9 y UGT1A7 contribuyen a la glucuronidación de SN-38: la isoforma 9 parece estar relacionada con menor actividad de la enzima y la 7 se expresa sobre todo en el tracto gastrointestinal. La dosis de irinotecan utilizada fue 180 mg/m² bisemanal conjuntamente con 5-FU. Se buscó la correlación con la toxicidad tras el primer ciclo y también con la peor de todo el tratamiento. Uno de los haplotipos encontrados, que incluían todos los alelos excepto UGT1A9*22, se correlacionaba con toxicidad hematológica, aunque solo con un OR=0.39 (95% CI, 0.19 - 0.82; p= 0.01). Con un riesgo más alto, se encontró relación para el alelo UGT1A7*3 alelo y paradójicamente UGT1A1*28 no se correlacionó con toxicidad hematológica¹⁰⁸.

Un meta-análisis del 2007 mostró una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo UGT1A1 y neutropenia severa en medianas y altas dosis de irinotecan (≥ 150 mg/m²), pero no la encontró para dosis <150 mg/m² ¹⁰⁹. Estos hallazgos apoyan la sugerencia de que, a menos que los pacientes que reciben irinotecan a una dosis mayor que 150 mg / m², ya sea sólo o en combinación con un fármaco mielotóxico o irinotecan a 100 mg / m² en combinación con otro agente mielotóxico (por ejemplo, el oxaliplatino), el aumento del riesgo de toxicidad no es "ni estadística ni clínicamente significativo". Sin embargo, un metanálisis más reciente que incluye estudios adicionales desde la fecha anterior y un total de 2000 pacientes, encuentra que en incluso en dosis bajas el alelo *28 confiere un riesgo importante a la toxicidad. Los resultados se muestran en la tabla 4. ¹¹⁰

	RR	95% CI, p
Dosis bajas	2.43	1.34-4.39 p=0.003
Dosis medias	2.00	
Dosis altas	7.22	

Tabla 4: riesgo relativo de neutropenia grave por UGT1A1*28 según dosis de irinotecan

La glucuronidación dosis-dependiente del SN-38 explica porqué la asociación entre UGT1A1*28 y la neutropenia es dosis dependiente.

Por otra parte, un hallazgo no siempre buscado pero coherente con la influencia del genotipo sobre la cinética del fármaco, fue que la misma dosis podría ser más efectiva en portadores de los *28. En la tabla 5 se muestran algunos estudios que muestran mejor supervivencia para estos genotipos.

Estudio	Variable eficacia	Resultado
Font et al (2003)	TTP	3 meses (*1/*1) vs. 4 m (*28/*28; *1/*28)
	SG	8 meses (*1/*1) vs 11 m (*28/*28; *1/*28)
	SG 1 año	21% (*1/*1) vs. 41% (*28/*28; *1/*28)
	SG 2 años	14% (*1/*1) vs. 31% (*28/*28; *1/*28)
Marcuello et al (2004)	SG	32 meses (*1/*1) vs. 24 m (*28/*28; *1/*28)
Toffoli et al. (2006)	HR	0.81 (95% CI 0.45–1.44) (*28/*28 vs. *1/*1)
	HR	0.84 (95% CI 0.58–1.21) (*1/*28 vs. *1/*1)
	SG	613 días (*1/*1) vs. 686 días (*28/*28) vs 669 días (*1/*28)

Tabla 5: Estudios que correlacionan UGT1A1+28 con eficacia

En el estudio de Marcuello, la supervivencia es peor para el genotipo poco metabolizador, sin embargo en todos ellos la tasa de respuestas es mayor en presencia de al menos un alelo *28: RR= 1.7; CI 1.24-2.33; P<0.001.

Esto señala un nuevo enfoque sobre el desarrollo de fármacos en la era de la medicina genómica: el uso de la información genética para una escalada de la dosis del fármaco en los ensayos clínicos fase I. Los fase I originales no estratificaban por genotipo de *UGT1A1* y por tanto, podría ser que los individuos *wild type* toleraran dosis más altas. En el publicado por Toffoli en 2009, la dosis

máxima tolerada (DMT) de irinotecan para pacientes CCR metastásico con un esquema tipo folfiri en primera línea, fue mayor en ausencia del alelo *28 que los 180 mg/m² teóricos:

*1/*1 → 370 mg/m²

*1/*28 → 310 mg/m²

La farmacocinética de irinotecan y su metabolito SN-38 era de tipo lineal. Concluían que la dosis estándar de 180 mg/m² en el esquema Folfiri es inferior a la que podrían tolerar los pacientes si se excluyen los que portan la variante con las 7 repeticiones

BEVACIZUMAB

Es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor de crecimiento del endotelio vascular que interviene en el crecimiento de los vasos sanguíneos y linfáticos. En el tejido normal existe un equilibrio entre los factores que promueven e inhiben la angiogénesis, mientras que en los tumores, debido a un aumento del factor de crecimiento del endotelio vascular hay una excesiva angiogénesis, siendo estos vasos producidos por el tumor más tortuosos.

La angiogénesis¹¹¹ tumoral consiste en una serie de complejos pasos consecutivos que llevan en último lugar a la formación de neovasos que suministran sangre y nutrientes a la masa tumoral. Por tanto, se trata de un proceso esencial tanto para el crecimiento del propio tumor como para el desarrollo de metástasis a distancia (diseminación hematógena). Las células neoplásicas, así como las células inmunes infiltrantes y/o las células de los tejidos sanos son capaces de secretar sustancias con actividad angiogénica. Cuando estos factores de crecimiento se unen a sus receptores específicos presentes en las células endoteliales, se favorece la proliferación, migración e invasión de las células endoteliales, con la consiguiente formación de los capilares sanguíneos.

En general está aceptado que ningún tumor sólido puede crecer por encima de un tamaño crítico de 1-2 mm o más de 10 millones de células sin un aporte vascular adecuado.

En la angiogénesis tumoral se dan dos fases separadas por el llamado "cambio angiogénico". Este proceso se produce cuando aparece un desequilibrio entre los factores pro y antiangiogénicos, a favor de los factores proangiogénicos. La primera es una fase avascular, en la que los tumores alcanzan un diámetro inferior a 1-2 mm. Estos tumores permanecen latentes, ya que se encuentran en un estado de equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis. Algunos de estos pequeños tumores conseguirán pasar a una segunda fase (fase vascular), en la que el tumor crece de forma exponencial.

Son múltiples los procesos que regulan la angiogénesis, sin embargo se considera que el factor de crecimiento endotelial vascular¹¹² (VEGF) tiene un papel central en la angiogénesis tumoral (Fig 9).

Existen al menos cuatro miembros en la familia de VEGF (VEGF-A, B, C y D). El gen VEGF está organizado en 8 exones dando lugar por splicing alternativo a 5 proteínas de 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos. El más importante de ellos es el VEGF-A, que consiste en una glicoproteína homodimérica básica de unión a la heparina de 45 kDa. El VEGF-A está formado por dos unidades idénticas. Esta sustancia actúa como molécula clave en la angiogénesis, puesto que estimula el crecimiento de las células endoteliales vasculares. El VEGF es un factor clave implicado en todos los pasos de la angiogénesis, es un potente mitógeno endotelial y promueve la degradación de la matriz extracelular, la proliferación, la migración, la diferenciación y la supervivencia endotelial. El VEGF es inducido a parte de por la hipoxia por EGF, PDGF, bFGF, IGF-1 y diversas citoquinas.

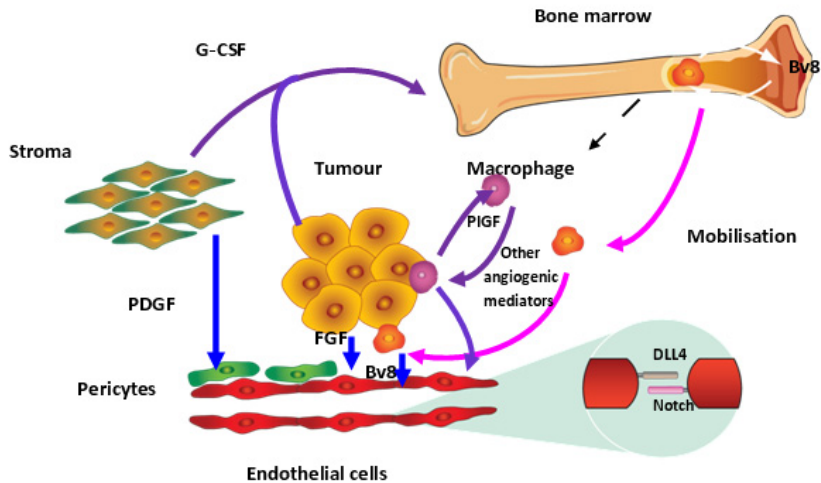


Fig 9: angiogenesis tumoral

Hay varios mecanismos propuestos de la resistencia a los agentes anti-angiogénicos, como el bevacizumab. Estos mecanismos pueden aplicarse tanto a resistencia adquirida e inherente y se pueden clasificar en varios mecanismos.

La primera puede ser a través de la regulación positiva alternativa o compensatoria de señales solubles pro-angiogénico VEGF¹¹³, tal como el factor de crecimiento placentario (un ligando para VEGFR1), el factor básico de crecimiento de fibroblastos, y el Bv8.

Además, el aumento de la cobertura de pericitos, predominantemente mediada por PDGF, mejora la supervivencia de las células endoteliales. Trabajos recientes, sugieren que una subpoblación de células mieloides derivados de la médula ósea son reclutados en el lecho tumoral y estimulan la angiogenesis. Además, otros factores movilizan un reclutamiento de macrófagos que juegan un papel estimulando la angiogenesis.

Por último, la señalización entre células adyacentes en las células endoteliales a través del ligando Noch sean más maduros y resistentes al tratamiento vascular. Evaluación

de la prevalencia y la importancia de estos factores puede orientar el desarrollo de nuevas estrategias anti-angiogénicas

CETUXIMAB

Cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une selectivamente al dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico¹¹⁴ (EGFR), una glicoproteína transmembrana que participa en las vías de señalización que afectan al crecimiento celular, diferenciación y supervivencia. La activación del EGFR también desencadena la internalización del receptor en un proceso que implica endocitosis en los surcos recubiertos de clatrina, los receptores internalizados son degradados dentro de los compartimentos endosómicos, o reciclados y devueltos a la superficie celular.

Fig 10

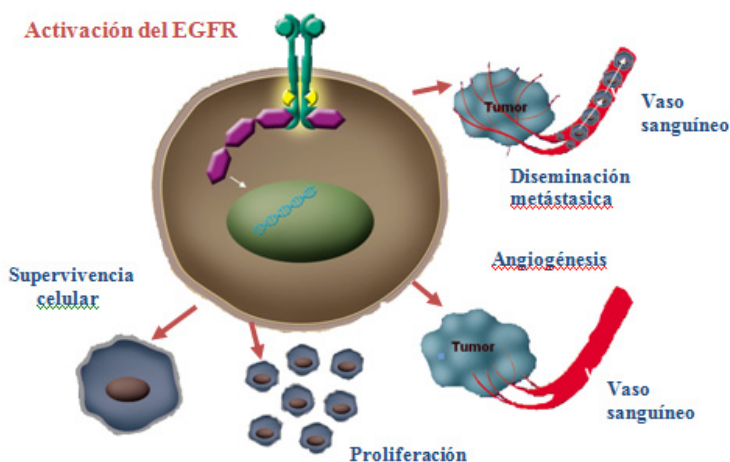


Fig 10: efectos de la activación de EGFR

Cetuximab bloquea el sitio de unión del EGFR, bloqueando la dimerización del receptor y evitando la fosforilación de la proteína tirosina cinasa del receptor mediada por el ligando y provocando la internalización del receptor sin estimular la fosforilación

de éste. La eficacia antitumoral del cetuximab resulta de múltiples mecanismos¹¹⁵ que incluyen la inhibición de la progresión del ciclo celular, promover la apoptosis, actividad antiangiogénica y posible intensificación de la actividad inmunitaria (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo). Ha demostrado inhibir la proliferación celular mediante la detención del ciclo celular en la fase G1, así como de disminuir el número de células en fase S debido a las elevadas concentraciones del inhibidor p27 de CDK2, lo que determina la fosforilación de la proteína Rb.

La interrupción del ciclo celular en la fase G1 induce la apoptosis por inducción de Bax, activación de la caspasa 8 y otras moléculas proapoptóticas. El broqueo de EGFR reduce la producción de factores angiogénicos como el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento endotelial vascular y la interleucina-8, este efecto produce una disminución en la densidad de microvasos y un aumento en la apoptosis de las células endoteliales. El cetuximab puede reducir la formación de metástasis mediante hiporregulación de la expresión de las metaloproteínas de la matriz, que tienen un papel clave en la adhesión de las células tumorales.

El oncogén ras codifica una familia de pequeñas proteínas homólogas a las proteínas G que regulan la transducción de señal que se encuentra en la cara interna de la membrana celular, actuando como un interruptor de dirección única para la transmisión al núcleo de señales de crecimiento extracelular.

Se han descrito mutaciones activadoras del gen KRAS¹¹⁶ (situado en el cromosoma 12) en el exón 1 (codones 12 y 13) y el exón 2 (codón 61). Estas mutaciones determinan la síntesis celular de una proteína mutada con una estructura que no permite el paso de RAS-GTP (forma activa) a RAS-GDP (forma inactiva), por lo que la vía KRAS permanece continuamente activada. Esta activación constitutiva de KRAS se ha relacionado con un crecimiento anormal celular al aumentar su capacidad proliferativa, progresión tumoral y con una falta de respuesta al tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR, ya que las mutaciones activadoras de KRAS y la consecuente activación de la vía regulada por KRAS determina que esta vía de señalización intracelular permanezca activa con independencia de si el EGFR se ha activado o inhibido terapéuticamente (Fig 10).

Diversos estudios (OPUS¹¹⁷ y CRYSTAL¹¹⁸) llevados a cabo también en pacientes en primera línea de tratamiento ponen de manifiesto que la presencia de KRAS nativo en pacientes tratados con cetuximab son los que obtienen un beneficio significativo en el tiempo.

El alto valor predictivo de las mutaciones de KRAS induce a pensar que la inhibición de la vía RAS/RAF/MAPK¹¹⁹ es responsable de la actividad clínica de los anti-EGFR.

Sin embargo, entre un 40-60% de los pacientes con KRAS nativo no responden al tratamiento, por tanto, esto sugiere que existen otros determinantes moleculares de respuesta que aún no se han identificado.

Existen estudios que ponen de manifiesto que el análisis del número de copias del gen EGFR puede ser un marcador predictivo interesante cuando se estudia por medido de fluorescencia o hibridación in situ cromosomal FISH¹²⁰ pero no por PCR cuantitativa, esta asociación fue confirmada en estudios posteriores realizados con panitumumab.

B-RAF¹²¹ es una serina-treonina quinasa efectora de RAS y que ha sido analizada recientemente en el CCRm en diversos estudios. Concretamente la mutación BRAF (V600E) (transversión de T a A en 1796 que crea una molécula constitutivamente activada que actúa como un oncogen) ha sido encontrada en el 4-15% de los casos de CCR.

Las tasas de mutaciones BRAF son del 8% al 10% y la correlación con una falta de respuesta a las terapias EGFR han sido confirmados en múltiples estudios¹²². En estadios II y III de la enfermedad, las mutaciones BRAF no tienen ningún efecto sobre la supervivencia libre de recaída, pero en aquellos que hacen recidiva, es un fuerte predictor negativo de respuesta. Esta paradoja puede explicarse por la alta incidencia de inestabilidad de microsatélites en tumores BRAF mutados (hasta un 40%), que es un reconocido marcador pronóstico favorable en estadios tempranos del CRC. El análisis mutacional BRAF¹²³ aún no se utiliza rutinariamente en la práctica clínica, sin embargo, la evidencia de su valor pronóstico y predictivo, posiblemente, sería adecuado incorporarlo en los ensayos de forma prospectiva.

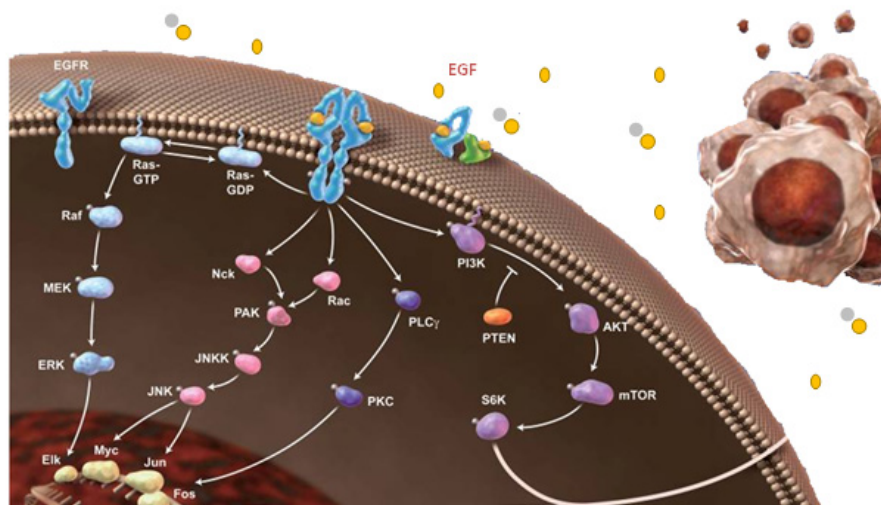


Fig 10: rutas de señales activadas por EGFR

En definitiva un 10% de los pacientes con KRAS WT pueden presentar resistencia a los anti-EGFR debido a mutaciones en B-RAF. Otras vías de señalización del EGFR diferentes de KRAS que podrían ser interesantes, este es el caso de PI3K/PTEN/mTOR.

PIK3CA codifica la proteína PI3K que es crítica en la señalización hacia AKT de la vía EGFR. Una mutación de PIK3CA¹²⁴ ha sido encontrada en el 10-18% del CCR, lo que sugiere que podría tratarse de un biomarcador predictivo de actividad de los anti-EGFR.

Algunos estudios señalan que un porcentaje de mutaciones en PIK3CA entre el 6 y el 18%, no quedando claro su papel como factor predictivo en pacientes que reciben tratamiento anti-EGFR. Un trabajo realizado¹²⁵ en 22 líneas celulares de CCR, encontró que la activación de PI3K o la pérdida de PTEN generan una resistencia mayor al cetuximab que las que tienen PI3K o PTEN “wild-type”. Estos autores vieron que 6 de las líneas celulares más resistentes tenían mutaciones o pérdida de expresión tanto en PIK3CA/PTK como en Ras/BRAF, mutaciones que pueden coexistir en el mismo tumor.

Sus datos sugieren que los pacientes que presentan alteraciones en ambas vías no responderían a cetuximab y que deberían ser exploradas otras dianas que sean inhibidoras de PI3K, AKT o mTOR o inhibidores de Ras, Raf o MEK. Por otro lado no todas las líneas que eran “wild-type” en ambas vías respondieron, lo que sugiere que pueden existir mutaciones que no hayan sido estudiadas en estas mismas vías.

PTEN¹²⁶ (fosfatasa y tensina homólogo) es un gen supresor localizado en el cromosoma 10q23.3 que codifica para una proteína que regula negativamente la vía PI3K/AKT. PTEN actúa sobre el segundo mensajero PIP-3 (fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato) producido por la actividad del PI3K (fosfoinositido 3-quinasa) y que fosforila a la proteína quinasa B (PKB)/AKT. La pérdida de PTEN aumenta la concentración de PIP-3 y por tanto de PKB/AKT aumentando la supervivencia celular y protegiéndola de los estímulos apoptóticos¹²⁷.

Los estudios existentes señalan que PTEN puede alterarse bien por mutaciones (10-19% de los casos) o por pérdidas alélicas (13-17%) habiéndose señalado su papel predictivo cuando se estudia su expresión por IHC en pacientes tratados con cetuximab¹²⁸. Por el momento no es posible establecer conclusiones al respecto.

Respecto a AKT los únicos estudios existentes han sido llevados a cabo para analizar tan sólo la frecuencia de mutaciones de este gen en diversos tumores y entre ellos el CCR. Varios estudios^{129,130} ponen en evidencia que las mutaciones de AKT en cáncer de colon son muy infrecuentes y que su análisis presenta un escaso interés, sin que se haya objetivado su posible valor predictivo al cetuximab.

HIPÓTESIS

CAPÍTULO II:

HIPÓTESIS

La eficacia de los tratamientos en el cáncer colorrectal es modesta y su toxicidad notable. Es crítico avanzar en el manejo de la enfermedad y optimizar los tratamientos disponibles, y esta necesidad se refleja en el documento del Consorcio de Grupos Cooperativos en Cáncer Colorrectal de 2007. En el capítulo de directrices futuras señala los análisis farmacogenéticos como herramienta para la individualización de la terapia. La utilización de biomarcadores conocidos en la práctica asistencial podría identificar las mejores opciones en eficacia y menor toxicidad. La variabilidad interindividual en respuesta a los fármacos y tolerancia ha sido ampliamente descrita^{131 132}. Se han buscado estrategias de optimización de la farmacoterapia, como la monitorización farmacocinética con el fin de individualizar las dosis, que no se han incorporado a la práctica clínica diaria y permanecen en el marco experimental¹³³. La distinta actividad de los enzimas metabolizadores o diana originan por una parte distinta cinética de eliminación y por otra distinta sensibilidad a la acción del fármaco. Con el conocimiento del genoma, se ha dado el primer paso para identificar los genes codificadores de estos enzimas. Las mutaciones o polimorfismos en estos genes generan distinta expresión y por tanto distinta actividad de la enzima con consecuencias clínicas. Esta es la base de la aplicación de la farmacogenética a la clínica. El estudio farmacogenético de los pacientes con cáncer de colon puede contribuir a mejorar los resultados de la quimioterapia tanto en eficacia como en seguridad mediante la selección del fármaco y posología adaptada a cada paciente individualmente.

OBJETIVO

CAPÍTULO III:

OBJETIVO

- ✓ Analizar la viabilidad de la incorporación del análisis farmacogenético a la práctica clínica habitual del cáncer colorrectal.
- ✓ Identificar los biomarcadores más útiles predictores de eficacia o toxicidad en las siguientes situaciones:
 - Pacientes con quimioradioterapia neoadyuvante de cáncer de recto estadios II y III. Analizar el papel predictivo de los biomarcadores asociados a reparación de daño de ADN por radiación, sensibilidad a 5FU o toxicidad por este fármaco.
 - Pacientes con cáncer colorectal metastásico a tratamiento con esquema folfox (fluorouracilo, folínico y oxaliplatino). Evaluar el valor predictivo de respuesta de un conjunto de polimorfismos implicados en el metabolismo, detoxificación o vías de reparación del ADN en pacientes con cáncer colorrectal metastático tratados con m-FOLFOX6.
 - Pacientes con cáncer colorectal metastásico a tratamiento con esquema folfiri (fluorouracilo, folínico e irinotecan). La toxicidad asociada al irinotecan es fundamentalmente dependiente de los polimorfismos de las enzimas metabolizadoras del fármaco. Valorar el papel del genotipo UGT1A1 como predictor de toxicidad en pacientes con cáncer colorrectal que reciben el esquema FOLFIRI.
- ✓ Comprobar si la determinación en tumor de recto mejora la capacidad predictiva de la línea germinal
 - Análisis comparativo de las variantes en línea germinal y en el tumor. La mayoría de estudios farmacogenéticos asumen la concordancia entre

los datos en línea germinal y somática. Por tanto, se ha seleccionado un grupo amplio de SNPs para evaluar la asociación de estos polimorfismos con los resultados clínicos tanto en sangre como en tejido tumoral con el fin de identificar herramientas útiles para predecir la respuesta a quimioradioterapia en pacientes con cáncer de recto.

MATERIAL Y MÉTODO

CAPÍTULO IV:

MATERIAL Y MÉTODO

- ✓ Estudio retrospectivo observacional de los pacientes con cáncer colorrectal estadio II-IV tratados en el Hospital Clínico Universitario de Santiago.
- ✓ CRITERIOS DE INCLUSIÓN:
 - Pacientes adultos mayores de 18 años con cáncer de colon o recto estadios II a IV histológicamente confirmado.
 - Firma del Consentimiento informado de acuerdo con el protocolo del estudio autorizado por el Comité Ético local. (anexo 1)
 - Diagnóstico clínico: colonoscopia, biopsia, hemograma y bioquímica con CEA, TC toraco-abdomino-pélvico. En enfermedad metastásica, además de lo anterior, resonancia magnética nuclear (RMN) o PET según criterio médico. En el caso de cáncer de recto, estudio del tumor primario por ecoendoscopia o RMN.
- ✓ TRATAMIENTO:
 - Aduvancia de colon o recto (estadios II y III):
 - folfox 6 modificado (oxaliplatino 85 mg/m² en 2 horas + leucovorin 200 mg/m² en Y seguido de 5-FU 400 mg/m² en bolus y a continuación 5-FU 2.400 mg/m² en infusión continua de 48 horas cada 2 semanas).
 - De Grammont: leucovorin 200 mg/m² en 1 hora seguido de 5-FU 400 mg/m² en bolus y a continuación 5-FU 2.400 mg/m² en infusión continua de 48 horas cada 2 semanas. Cada ciclo se consideran 2 administraciones, el tratamiento estándar es 6 ciclos.

- Tratamiento de enfermedad metastásica:
 - Folfox 6 modificado como se describió anteriormente hasta progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable u otro criterio médico con o sin anticuerpos monoclonales (bevacizumab 5 mg/m² cada 2 semanas o cetuximab 250 mg/m² semanal, la primera vez 400 mg/m² como dosis de carga)
 - Folfiri (irinotecan 180 mg/m² en 90 minutos + leucovorin 200 mg/m² en Y seguido de 5-FU 400 mg/m² en bolus y a continuación 5-FU 2.400 mg/m² en infusión continua de 48 horas cada 2 semanas). Cada ciclo se consideran 2 administraciones. Se puede administrar con o sin anticuerpos monoclonales según criterio médico (bevacizumab 5 mg/m² cada 2 semanas o cetuximab 250 mg/m² semanal, la primera vez 400 mg/m² como dosis de carga)
 - Irinotecan + cetuximab: en pacientes metastásicos en progresión a Folfiri.
- Neoadyuvancia de cáncer de recto (estadios II y III):
 - Radioterapia con una dosis total de 50.4 Gy (en 28 fracciones de 1.8 Gy) con 5-FU en infusión continua de 225 mg/m²/día desde la semana 1 a 5.
- Cirugía mesorrectal del tumor 6 a 8 semanas después del final de la quimiorradioterapia. El procedimiento quirúrgico incluye resección abdominoperineal, resección anterior y procedimiento de Hartman.

✓ FUENTE DE LOS DATOS CLÍNICOS:

Se han obtenido de la revisión de la historia convencional y electrónica IANUS®. Las variables recogidas fueron edad, sexo, diagnóstico, tratamiento recibido, reducciones o retrasos de las dosis, uso de filgastrim, evaluaciones de respuesta y toxicidades.

✓ VARIABLES CLÍNICAS:

Se evaluó la eficacia del tratamiento cada 3 ciclos y cada 3 meses posteriormente, mediante TC y/o RMN según criterios RECIST versión 3.0.¹³⁴

○ RESPUESTA según RECIST:

- Respuesta Parcial (RP): descenso de al menos el 30% de la suma de los diámetros mayores de las lesiones diana.
- Respuesta Completa (RC): desaparición de todas las lesiones diana.
- Enfermedad Estable (EE): o bien no hay cambio en el tamaño de las lesiones o su variación no alcanza los criterios de RP o PE. No puede haber ninguna lesión nueva.
- Progresión enfermedad (PE): incremento del 20% en la suma de los diámetros mayores de las lesiones diana, o aparición de alguna lesión nueva.

○ La RESPUESTA PATOLÓGICA a la neoadyuvancia del cáncer de recto se evaluó sobre la pieza quirúrgica.

- Downstaging: El estadio histopatológico se establece según la clasificación pTNM IUCC 1997. SE considera downstaging cuando se constata una disminución de al menos un estadio T y un estadio UICC con respecto al estadio clínico inicial.
- El Grado de Regresión Tumoral se llevó a cabo en los especímenes quirúrgicos según un sistema semicuantitativo de 5 puntos establecido por Mandard¹³⁵ :
 - GRT1: ausencia de cáncer residual
 - GRT2: presencia de escasa células cancerosas de forma residual
 - GRT3: mayor presencia de células cancerosas residuales pero con predominio de fibrosis.
 - GRT4: cáncer residual con áreas de necrosis
 - GRT5: ausencia de cambios regresivos.

○ SUPERVIVENCIA:

- Supervivencia Libre de Progresión: tiempo en días desde el diagnóstico hasta la progresión de la enfermedad.
- Supervivencia Libre de Recaída: tiempo en días desde el inicio de tratamiento hasta la recurrencia del tumor.
- Supervivencia Global: tiempo en días desde el diagnóstico hasta le fallecimiento por cualquier causa.

- TOXICIDAD: se ha valorado según la escala Common Toxicity Criteria del National Cancer Institute (NCI) versión 3.0¹³⁶

✓ MUESTRAS:

- Se recogieron 10 ml de sangre periférica en EDTA por paciente en una extracción rutinaria para el manejo de la enfermedad. Posteriormente se enviaron al laboratorio para la extracción de ADN.
- En el caso de los tumores de recto, reutilizaron las muestras seleccionadas por el Servicio de Anatomía Patológica de los bloques parafinados de las biopsias al diagnóstico, antes de cualquier tratamiento.
- El ADN genómico se obtuvo a partir de leucocitos de las muestras de sangre periférica mediante el kit de purificación basado en partículas magnéticas Chemagen (Chemagen, Baesweiler, Germany). El ADN tumoral se extrajo de muestras fijadas en formol y parafinadas tras un tratamiento con xileno. Para la extracción se empleó el kit QIAamp® DNA Mini Kit Extraction Column (Qiagen®, CA, USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN obtenido fue congelado rápidamente a -20°C.

✓ GENOTIPADO:

- Los polimorfismos en XRCC1, ERCC1, ERCC2, GSTP1, MTHFR y DPYD se analizaron por el método de **SnapShot**. Los cebadores de PCR Multiplex y sondas SnapShot se enumeran en la tabla xx. Cada sonda se sintetizó con una cola de poli(dT) de diferente longitud para permitir la separación de los productos de SnapShot en función de su tamaño. La PCR Multiplex se realizó usando el kit de Qiagen PCR Multiplex siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones del termociclador fueron: 95 ° C durante 5 min, 35 ciclos de 95 ° C por 45 seg, 60 ° C por 45 seg, 72 ° C por 45 seg y finalmente 10 minutos a 72 ° C. Los productos PCR fueron tratados con 3 unidades de SAP (shrimp alkaline phosphatase) y 2 unidades de exonucleasa I para eliminar el exceso de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y cebadores, respectivamente. El análisis SnapShot se realizó utilizando el Kit SNaPshot Multiplex (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las reacciones de extensión consistieron en 35 ciclos de desnaturalización a 95 ° C durante 10 segundos e hibridación / extensión a 58,5 ° C durante 40 seg. Los productos de extensión marcados fueron tratados con SAP (1 unidad por cada muestra). 1 µl del producto de extensión se mezcló con 9,8 µl de formamida HiDi™ (Applied Biosystems) y 0,2 µl del marcador de peso molecular GeneScan™ 120 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems). Los productos fueron desnaturalizados a 95 ° C durante 5 minutos y luego separados utilizando el secuenciador capilar ABI 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) con una longitud de capilar de 36 cm y un polímero optimizado (POP-7™, Applied Biosystems). El análisis de resultados se realizó utilizando el programa GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems).
- **Análisis de secuenciación:** El polimorfismo de la región promotora TYMS (5'VNTR) se analizó por secuenciación. Los cebadores de la PCR

se muestran en la Tabla 2. Las condiciones de reacción de PCR fueron 95° C durante 5 min, 35 ciclos de 95 ° C durante 30 seg, 58 ° C durante 30 seg, 72 ° C durante 90 segundos y, finalmente, 7 min a 72 ° C. Después de la purificación de los productos mediante el tratamiento con ExoSAP-IT® (GE Healthcare), las reacciones de secuenciación se realizaron utilizando los mismos cebadores y el Kit de secuenciación Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems). Los productos fueron purificados mediante las placas MultiScreen™ Kit (Millipore, MA, USA) y se analizaron en el secuenciador capilar ABI 3730XL. Los genotipos se agruparon en TYMS alta expresión (2R/3G, 3C/3G, genotipos 3G/3G) o baja expresión (2R/2R, 2R/3C, genotipos 3C/3C) para el análisis estadístico.

- **Análisis de fragmentos fluorescentes:** El polimorfismo 3'UTR TYMS, las variantes de repetición en la región promotora del EGFR (CA) y la inestabilidad de microsatélites (MSI) se analizaron mediante análisis de fragmentos fluorescentes. Los cebadores están enumeradas en la tabla 2. Las condiciones de reacción de PCR para 3'UTR-TYMS fueron de 95 ° C durante 5 min, 35 ciclos de 95 ° C durante 1 min, 55 ° C durante 1 min, 72 ° C durante 1 min y, finalmente, 7 min a 72 ° C. Las condiciones de reacción de PCR para EGFR fueron 95 ° C durante 5 min, 35 ciclos de 94 ° C por 30 seg, 60 ° C por 40 seg, 72 ° C durante 40 segundos y, finalmente, 7 min a 72 ° C. La MSI se analizó mediante el Sistema de Análisis de MSI, Versión 1.2 (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Los genotipos se resolvieron en el secuenciador capilar ABI 3730XL y para la determinación de la longitud de los alelos los resultados fueron analizados utilizando el software GeneMapper. Los genotipos de repetición en la región promotora del EGFR (CA) se agruparon en > 21 repeticiones CA o = <21 repeticiones CA para el análisis estadístico.

Cebadores para la PCR Multiplex	
DPYD_IVS14F	GAAACGGCTGCATATTGGT
DPYD_IVS14R	TTCACCAACTTATGCCAATTCT
MTHFR_C677T_F	TCACAAAGCGGAAGAATGT
MTHFR_C677T_R	GCCTCTCTGACTGTCTATC
MTHFR_A1298C_F	CTTTGTGACCATTCGGTTT
MTHFR_A1298C_R	TTTGGGGAGCTGAAGGACTA
XRCC1_F	TCTGACTCCCCTCCAGATT
XRCC1_R	GCCCCTCAGATCACACCTA
ERCC1_F	TCCAGAACTGGGACATGA
ERCC1_R	TCCCTATTGATGGCTTCTGC
ERCC2_F	GGCAAGACTCAGGAGTCACC
ERCC2_R	CCCTCTCCCTTCTCTGTT
GSTP1_565_F	CTGCAATCCTTGCCCTGT
GSTP1_565_R	GCTGGAGGTCTCTGCTCTT
Sondas SnapShot	
DYPD-56BPR	ATAAACATTACCAACTTATGCCAATTCTCTGTTTTAGATGTTAAATCACACTTA
MTHFR-C677T-44BPR	AGAAATGTGTCAGCCTCAAAGAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCG
MTHFR_A1298_50BPR	TCCGGTTTGTTCTCCCCGAGAGGTAAGAACAAGACTTCAAAGACACTT
XRCC1_20BPR	GGCGTGTGAGGCCTTACCTC
ERCC1_32BPF	AGGGGCAATCCCGTACTGAAGTTCGTGCGCAA
ERCC2_26BPF	AGCAGCTAGAATCAGAGGAGACGCTG
GSTP1-35- BPR	CTTGCCCGCCTCATAGTTGGTGTAGATGAGGGAGA
Cebadores para TYMS 5'UTR	
TYMS_28BP_F	CTCCGTTCTGTGCCACACC
TYMS_28BP_R	GGAGGATGTGTTGGATCTGC
Cebadores para TYMS 3'UTR	
TYMS_6BP_F	TGAATTCACAAGCTATTTTTGG
TYMS_6BP_R	GCAGAACTTCTTTATTATAGCAACA

Table 6. Primers and probes

- ✓ **ANÁLISIS ESTADÍSTICO:** se ha usado la prueba de chi-cuadrado para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg. Las asociaciones entre los parámetros específicos y de la condición de polimorfismos fueron evaluados por la prueba exacta de Fisher. Todos los valores de P son con dos colas y valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Se utilizó un análisis de regresión logística binaria para determinar la asociación independiente entre marcadores genéticos y el grado de regresión tumoral (TRG). El análisis se ajustó por las variables clínicas y demográficas que se especifican en cada artículo. Las supervivencias se estudiaron mediante curvas de Kaplan-Meier, test log-rank y regresión de Cox. El análisis estadístico se realizó en SPSS (versión v17, SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.)

- ✓ **VARIABLES FARMACOGENÉTICAS:** Las variantes genéticas analizadas se escogieron tras una revisión de la literatura y se seleccionaron aquellas que en el momento del inicio del estudio tuviera evidencia científica que relacionara el genotipo con el fenotipo que nos interesa (Tabla 7).

FÁRMACO	GEN	POLIMORFISMO	EFFECTO BIOQUIMICO	EFFECTOS SECUNDARIOS ASOCIADOS
Irinotecan 137,138	UGT1A1	PROMOTOR: [(TA)NTAA] WT:TA6 UGT1A1*28:TA7	disminución del 70% de la actividad transcripcional	neutropenia diarrea astenia...
5-FU	1)DPYD 139,140	IVS14+1 G->A DPYD*2 (alelo inactivo más común- 50% de los casos)	delección del exon 14 de 165bp (skipping)	toxicidad sanguínea y digestiva
	2) TYMS 141	a) VNTR de 28 bps en región promotora ¹⁴² ; WT: TSER*2 MUT: TSER*3 SNP asociado (c) c) SNP G->C en nucleótido 12 de segunda repetición en TSER*3 ¹⁴³ b) Delección de 6bp en 3'UTR ^{144 145}	a más repeticiones aumenta la eficacia en la traducción haplotipos de alta y baja expresion Alta:2R/3G,3C/3G,3G/3G BAJA:2R/2R,2R/3C,3C/3C disminuye la estabilidad del mRNA	niveles proteicos de TS inversamente relacionados con respuesta clínica al tumor mayor supervivenica en los grupos de baja expresión
	3) MTHFR 146	a) SNP C677T ¹⁴⁷ b) SNP A1298C ¹⁴⁸		factores independientes de la respuesta del paciente al tratamiento del CCR con 5fu
OXALIPLATINO 149	1)XRCC1	Arg399Gln (rs 25487)	niveles incrementados de adn debido a una inadecuada reparación o aumento de tolerancia	pacientes con uno de los alelos mutados tienen un riesgo cinco veces mayor de fallo en la terapia ox+5fu
	2)ERCC1	Asn118Asn (rs 11615)	cambio en la expresión	relacionado con la respuesta y supervivencia de los pacientes
	3)ERCC2 (XPD)	Lys751Gln (rs 13181)		pacientes homocigotos mostraron una probabilidad 6-12 veces mayor de progresión de crc.
	4)GSTP1	Ile105Val (rs 1695)	menos capacidad de detoxificación de carcinógenos	mayor tasa de supervivencia en terapia 5fu/ox en individuos homocigotos para la mutación
	5)EGFR	Repeticiones CA en intrón 1 wt: 16 mut: 16/18 16/20 (rs 11568315)		peor respuesta en los individuos con 16 repeticiones a oxali/5fu

Tabla 7: Variables genéticas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO V:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Artículo 1: Use of a comprehensive panel of biomarkers to predict response to a fluorouracil-oxaliplatin regimen (mFOLFOX6) in patients with metastatic colorectal cancer.

Artículo 2: The value of genetic polymorphisms to predict clinical response and toxicity in metastatic colorectal patients with irinotecan-based regimens.

Artículo 3: X-ray completing group 1 (XRCC1) and Thymidylate Synthase polymorphisms may predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer patients

Artículo 4: Pharmacogenetic analysis in neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer: high incidence of somatic mutations and their relation with response.

Artículo 1: Use of a comprehensive panel of biomarkers to predict response to a fluorouracil-oxaliplatin regimen (mFOLFOX6) in patients with metastatic colorectal cancer.

Maria J Lamas, Goretti Duran, Emilia Balboa, Beatriz Bernardez, Manuel Touris, Yolanda Vidal, Elena Gallardo, Rafael Lopez, Angel Carracedo, and Francisco Barros.

Pharmacogenomics
Article in press

ABSTRACT/ RESUMEN:

Objetivo: Los polimorfismos del metabolismo, detoxificación o de las vías de reparación del ADN se han propuesto como posibles factores predictivos de respuesta a 5-fluorouracilo y oxaliplatino. Hemos estudiado el valor predictivo de un conjunto de polimorfismos genéticos de línea germinal en pacientes con cáncer colorrectal metastásico tratados con mFOLFOX-6.

Métodos: 72 pacientes, 50 hombres (69,4%) fueron incluidos después de firmar un consentimiento informado. La mediana de edad fue de 65,5 años (32-80). Todos ellos recibieron mFOLFOX-6. Se extrajo el ADN de muestras de sangre periférica y el genotipo se obtuvo por secuenciación directa, SnapShot[®] y técnicas de PCR multiplex. Se estudiaron 8 polimorfismos dentro de 6 genes fueron investigados: TS 5'UTR (VNTR + G / C), TS 3'UTR (TS1494del6); MTHFR C677T y A1298C; GSTP1 I105V; ERCC1 C118T; XPD Lys751Gln y XRCC1 Arg399Gln. La asociación se evaluó mediante un análisis univariante y la supervivencia mediante regresión de Cox y Kaplan Meier. El comité de ética local aprobó el protocolo del estudio farmacogenético y todos los sujetos firmaron un consentimiento informado antes de participar en el estudio.

Resultados: La muestra estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg. Sólo XPD-751 Lys / Gln se relacionó de forma significativa con una supervivencia libre de progresión (PFS). La mediana de SLP de XPD-751 Lys / Gln pacientes (n = 33) fue de 16 meses (95% IC, 9,2 a 22,7), 10 meses (95% IC, 6,1 a 13,9) para Gln / Gln (n = 11) y 8 meses (95% IC, 5,8 a 10,2) para Lys / Lys (n = 28), p = 0,019. El aumento del riesgo de progresión fue de: 1.93 (95% IC, 1,13-3,30, p = 0,017) para Lys / Lys y 2,1 (IC95%: 1,01-4,22, p = 0,047) para Gln / Gln. Los pacientes con uno o dos alelos Val de GSTP1 tendían a un menor riesgo de progresión en comparación con los homocigotos Ile / Ile, p = 0,067. Cuando se analizaron conjuntamente XPD-751 y GSTP1, los pacientes que portaban uno o dos genotipos favorables, Lys / Gln y Val mostraron una mediana de PFS de 11 meses (95% IC, 7,4 a 14,6) frente a los 6 meses (95% IC, 4,6 - 7,4) de los pacientes con el genotipo no favorables, p <0.001.

Conclusiones: En los pacientes con cáncer colorrectal metastásico tratados con la combinación de mFOLFOX, el haplotipo XPD-751 Lys/Gln-GSTP1-105Val parece predecir el riesgo de progresión.

30th November 2010

Re: Acceptance of article for *Pharmacogenomics*

To Whom It May Concern:

This is to confirm that the article "Use of a comprehensive panel of biomarkers to predict response to a fluorouracil-oxaliplatin regimen (mFOLFOX6) in patients with metastatic colorectal cancer", whose first author is MJ Lamas, is accepted for publication to appear as a 'Preliminary Communication' in *Pharmacogenomics*, with a provisional publication date of March 2011 (please note, the final publication date may alter due to journal page constraints) DOI:10.2217/PGS.10.196.

Pharmacogenomics, a publication of Future Medicine Ltd, reflects research advances in the new era of pharmacogenomics research. The audience of *Pharmacogenomics* consists of clinicians, research scientists, decision-makers and a range of professionals in the healthcare community.

We gratefully acknowledge the outstanding services of authors such as Dr Lamas, ensuring the high publication quality of *Pharmacogenomics*.

With kind regards



--

Tarryn Greenberg

Managing Commissioning Editor
Future Science Group
Unitec House
2 Albert Place
London N3 1QB
UK

T: +44 (0)20 8371 6090

F: +44 (0)20 8343 2313

E: t.greenberg@futuremedicine.com

Authors: Maria J Lamas ⁽¹⁾, Goretti Duran ⁽¹⁾, Emilia Balboa ⁽²⁾, Beatriz Bernardez ⁽¹⁾, Manuel Touris ⁽¹⁾, Yolanda Vidal ⁽³⁾, Elena Gallardo ⁽³⁾, Rafael Lopez ⁽³⁾, Angel Carracedo ⁽²⁾⁽⁴⁾ and Francisco Barros ⁽²⁾.

(1) Oncology Pharmacy Unit, Complejo Hospitalario Universitario of Santiago (CHUS), Choupana S/N, Santiago de Compostela 15706, Spain

(2) Molecular Medicine Unit, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Choupana S/N, Santiago de Compostela 15706, Spain.

(3) Department of Medical Oncology, CHUS, Choupana S/N, Santiago de Compostela 15706, Spain.

(4) Genomic Medicine Group-CIBERER, University of Santiago de Compostela, Calle San Francisco S/N, Santiago de Compostela 15705, Spain.

Title: Use of a comprehensive panel of biomarkers to predict response to a fluorouracil-oxaliplatin regimen (mFOLFOX6) in patients with metastatic colorectal cancer.

ABSTRACT

Background: Polymorphisms in the metabolism, detoxification or DNA-repair pathways have been proposed as potential predictors of response to 5fluorouracil and oxaliplatin. We have studied the predictive value of a set of germline genetic polymorphism in metastatic colorectal cancer patients treated with mFolfox-6.

Methods: 72 patients, 50 men (69.4%) were included after signing an informed consent. Median age was 65.5 years (32-80). All of them received m-6. DNA was extracted from peripheral blood samples and genotyped by direct sequencing, SnapShot® and Multiplex PCR techniques. 8 polymorphisms within 6 genes were investigated: *TS 5'UTR* (VNTR + G/C), *TS 3'UTR* (TS1494del6); *MTHFR C677T* and *A1298C*; *GSTP1 I105V*; *ERCC1 C118T*; *XPD Lys751Gln* and *XRCC1 Arg399Gln*. Association was evaluated by univariate analysis, and Cox regression and Kaplan Meier assessed survival. The local ethics committee approved the pharmacogenetic study protocol and all subjects signed an informed consent before participating in the study

Results: The sample was in Hardy-Weinberg equilibrium. Only *XPD-751 Lys/Gln* was found to be significantly associated with a favorable progression-free survival (PFS). Median PFS for *XPD-751 Lys/Gln* patients (n=33) was 16 months (95% CI, 9.2 – 22.7), 10 months (95% CI, 6.1 – 13.9) for *Gln/Gln* (n=11) and 8 months (95% CI, 5.8 – 10.2) for *Lys/Lys* (n=28), p=0.019. The increased risk of progression was: 1.93 (95% CI, 1.13-3.30; p=0.017) for *Lys/Lys* and 2.1 (95% CI, 1.01-4.22; p=0.047) for *Gln/Gln*. Patients with one or two Val alleles of *GSTP1* tended to a lower risk of progression compared to *Ile/Ile* homozygotes, p=0.067. When analyzed jointly *XPD-751* and *GSTP1*, patients who carried one or two favorable genotype, *Lys/Gln* and *Val* showed a longer median

PFS: 11 months (95% CI, 7.4 – 14.6) compared to 6 (95% CI, 4.6 – 7.4) with none favorable genotype, $p<0.001$.

Conclusions: In metastatic colorectal cancer patients treated with mFolfox the combination of haplotype *XPB-751 Lys/Gln-GSTP1-105Val* seems to predict the risk of progression.

Keywords: biomarkers, pharmacogenetic, XPB-751, GSTP1, colorectal cancer, mFOLFOX, oxaliplatin.

INTRODUCTION

Colorectal cancer is the third most common malignant disease and the second most frequent cause of cancer-related death in the United States and most European countries. Among 20% of these patients will already present with metastatic disease at the time of their diagnosis^{1,2}. Standard treatment has evolved from 5-fluorouracil (5-FU) with a median overall survival of 12 months or less and an overall response rate of 10% to combinations with oxaliplatin or irinotecan that have improved dramatically survival^{3,4}. The combination of oxaliplatin with fluorouracil exhibits clinical synergy since patients treated with this combination achieve significantly higher response rates and longer times to tumor progression than those treated with either drug alone⁵. With the introduction of biological agents, an anti-vascular endothelial growth factor receptor monoclonal antibody and an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody should prolong overall survival and response rate.

Resistance to platinum agents has been attributed to enhanced tolerance to platinum DNA adducts, decreased drug accumulation and enhanced DNA repair. Glutathione, a ubiquitous tripeptide, is an important host defense molecule against a range of toxins including metal compounds such as cisplatin. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) participates directly in the detoxification of platinum compounds and is an important mediator of both intrinsic and acquired resistance to platinum⁶. Several previous studies have investigated the association of *GSTP1 Ile105Val* with oxaliplatin efficacy and toxicity, but results of these studies were inconclusive. Individuals homozygous for a SNP in exon 5 at position 313 A→G in the *GSTP1* gene achieve an improved survival benefit from oxaliplatin/5-FU therapy⁷, however more recent studies report no association of *GSTP1* genotype with PFS^{8,9}.

ERCC1 is an endonuclease of the nucleotide excision repair (NER) system that acts not only in the single-strand annealing repair but also in the homologous repair of the double strand break. High ERCC1 levels are associated with an increased platinum resistance^{10, 11}. ERCC2, or XPD, plays an important role in DNA repair by eliminating bulky DNA adducts produced by environmental toxins and xenobiotics through the NER pathway.

Another noteworthy pathway involves the X-ray repair cross complementing group 1 (XRCC1) which is one of rate-limiting members of base excision repair (BER) and interacts with other proteins involved in several stages of the BER pathways including repairing specific base damage caused by oxaliplatin¹². In individuals with the variant Arg399→Gln codon, increased DNA damage marker levels are attributed to inadequate repair or increased damage tolerance¹³. *XRCC1* polymorphism increases the risk of oxaliplatin resistance. *XPD Lys751Gln* polymorphism may be an important marker in the prediction of clinical outcome to platinum-based chemotherapy. This was supported by another study showing marked difference in progression and overall survival in metastatic colorectal cancer patients who had *XPD Lys751Gln* SNP and treated with first-line chemotherapy^{6,14}. *XPD Lys751Gln* polymorphism causes an increase or a decrease in NER activity since, depending on the assay used to test DNA repair capacity.

The antitumor effect of 5-FU has ascribed to the competitive inhibition of thymidylate synthase (TS). Level of TYMS expression¹⁵ and the degree of activity of Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)¹⁶ have been associated with treatment effectiveness and toxicity, although the latter is mainly related to dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) activity¹⁷. No data were reported on *TS* and *DPYD* as predictive

markers for single-agent oxaliplatin, although low TS levels were predictive for a better response to the combination oxaliplatin and 5-FU¹⁸.

We selected a comprehensive panel of SNPs involved in drug metabolism, DNA repair, nucleotide excision repair, base excision repair and evaluated the associations of these polymorphisms with clinical outcomes and PFS.

MATERIALS AND METHODS

All patients in this study had histologically confirmed diagnosis of advanced stage adenocarcinoma of the colon or rectum, with a performance status of 0 to 2 according to the WHO scale. These patients were treated with 5-FU/oxaliplatin based chemotherapy. Oxaliplatin (85 mg/m²) was administered by intravenous (i.v) 2h infusion concurrent with leucovorin (200 mg/m²) and immediately followed by 5-FU (400 mg/m²) given as a i.v bolus on day 1 and followed by 5-FU (2400 mg/m²) as a continuous 46h infusion. The sums of oxaliplatin doses and of 5-FU doses administered during the cycles of m-Folfox therapy were captured, as well as number of cycles, total cumulative drug dose and description of treatment delays and /or reductions. Treatment was repeated every 2 weeks until progression or unacceptable adverse reactions. All toxicities were graded according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria CTC v3.0. Peripheral sensory neuropathy was graded according an oxaliplatin-specific scale grades: grade 1, loss of deep tendon reflexes or paresthesia not interfering with function; grade 2 sensory alteration or paresthesia interfering with function but not activities of daily living; grade 3 sensory alteration or paresthesia interfering with activities of daily living and grade 4, disabling. For each patient, we recorded the maximum observed toxicity grade (anaemia, neutropenia, thrombocytopenia, diarrhea, neurotoxicity and

nausea or vomiting). Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) support was allowed if neutropenia compromised treatment schedule. We evaluated response according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors criteria (RECIST) by CT scan. Objective response was evaluated after 3 cycles of treatment and every 3 months. Response was classified as complete response (CR), partial response (PR), stable disease (SD) or progressive disease (PD) according to the RECIST criteria. For this study, patients with CR, PR or SD were classified as responders, and patients when progressing during treatment (PD) were classified as non-responders. Relevant clinical data were obtained from clinical records (gender, age, performance status, number of metastatic sites, colon vs rectum involvement)

The primary end-point of the pharmacogenetic study was to investigate the association between genotypes and progression-free survival (PFS) defined as the time from the start of chemotherapy to the disease progression or death. The local ethics committee approved the pharmacogenetic study protocol and all subjects signed an informed consent before participating in the study. Clinical data were obtained by retrospective chart review.

Molecular analyses

DNA was extracted from peripheral blood samples collected from 72 colorectal cancer patients on day 1 of treatment.

The *TS* promoter region polymorphism (5'VNTR) was analyzed by sequencing. The *TS* 1494del6 polymorphism and *EGFR* (CA)_n repeat polymorphism were analyzed by fluorescent fragment analysis. Polymorphisms at *MTHFR*, *XRCC1*, *ERCC1* and *DPYD* were analyzed by SnapShot method. Conditions and techniques have been recently described in a paper of our group¹⁹.

Statistical Analysis: The purpose of this analysis was to evaluate the association between the polymorphism and demographics data, response to chemotherapy and survival time. The X^2 test was used to compare the observed genotype distributions with those expected by the Hardy-Weinberg equilibrium. The X^2 and Fischer's exact test were used for the categorical variables to evaluate the association of the expression of genetic markers and the response to chemotherapy. In addition binomial logistic regression methods were used to determine the strength of influence of the selected SNPs upon response prediction and coded with dummy indicator variables. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated for each genotype compared with the homozygous for the major allele (the allele with greater frequency among controls), which were set as the reference genotype.

Each genotype was independently analyzed, and a combined analysis was planned if multiple genotypes showed a significant association. The association between genotypes and PFS was estimated by computing hazard ratios and their 95% CI from Cox proportional hazards regression models. PFS curves were estimated using the Kaplan-Meier method and the log-rank test was used to compare the curves. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Analyses were done using SPSS version 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

RESULTS

A total of seventy-two patients, 50 men (69.4%) and 22 women (30.6%), average age of 65.5 (range 32-80), were enrolled into this study and their characteristics are shown in Table 1. Germline DNA of those patients was genotyped for *XRCC1*, *XPB*, *ERCC1*, *ERCC2*, *MTHFR*, *DPYD*, *EGFR* and *TYMS* polymorphisms and correlated to outcome and survival.

The analysis of the polymorphism located at *XPB* codon 751 showed that 28 (38.9%) were homozygous for *Lys/Lys* genotype, 33 (45.8%) were heterozygous for the *Lys/Gln* genotype, and 11 (15.3%) were homozygous for *Gln/Gln*. The *GSTP1-105* genotype distribution was as follows, 35 (48.6%) *Ile/Ile*, 30 (41.7%) *Ile/Val* and 7 (9.7%) *Val/Val* genotypes. Allelic distribution of both genes was in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium.

Only *XPB-751 Lys/Gln* was found to be significantly associated with a favorable progression-free survival (PFS) but not for OS ($p=0.377$). Median PFS for *XPB-751 Lys/Gln* patients ($n=33$) was 16 months (95% CI, 9.2 – 22.7), 10 months (95% CI, 6.1 – 13.9) for *Gln/Gln* ($n=11$) and 8 months (95% CI, 5.8 – 10.2) for *Lys/Lys* ($n=28$), $p=0.019$, figure 1. Using the *XPB-751 Lys/Gln* genotypes as reference, patients with *Lys/Lys* genotypes demonstrated an increased risk of progression of 1.93 (95% CI, 1.13–3.30; $p=0.017$) and the risk of progression of 2.1 (95% CI, 1.01–4.22; $p=0.047$) for *Gln/Gln* genotype. Patients with one or two Val alleles of *GSTP1* tended to a lower risk of progression compared to *Ile/Ile* homozygotes, significance was borderline $p=0.067$, figure 2. The median PFS for patients with a *Val/Val* and *Ile/Val* ($n=37$) genotypes was 11 months (95% CI, 8.02 – 13.97) compared with 8 months (95% CI, 5.82 – 10.17) in patients with the *Ile/Ile* genotypes ($n=35$). The median OS for patients with the *GSTP1*

for Val-containing genotype was 44 months (95% CI, 27.8 – 60.2) compared with 19 months (95% CI, 13.2 – 24.8) in patients with the *Ile/Ile* genotypes, $p=0.015$.

When analyzed jointly *XPB-751* and *GSTPI*, patients who carried one or two favorable genotype, *Lys/Gln* and *GSTPVal*, ($n=54$) showed a longer median PFS: 11 months (95% CI, 7.4 – 14.6) compared to 6 months (95% CI, 4.6 – 7.4) with none ($n=18$) favorable genotype, $p<0.001$, figure 3. Also, statistical differences were observed when OS was assessed according to their genotypes, 14 months (95% CI, 8.5 – 19.5) for patients with none favorable genotypes and 39 months (95% CI, 26.1 – 51.9) for favorable genotype group, $p<0.001$, figure 4.

We haven't found any relationship between survival and the other genotypes. Results are shown in table 2. Relationship between efficacy and *GSTPI* or *XPB* genotypes according to the use of antibodies are shown in table 3. Results seemed consistent in both subsets but without statistical significance due to the small size of subgroups.

Distribution of genotypes and response to chemotherapy are summarized in Table 4. For association analysis, responding patients were those with complete or partial response and stable disease, whereas patients with progressive disease were named as non-responders. Response rate (RR) was as follows: in 56 patients (77.8 %), disease was controlled by chemotherapy, 5 CR, 33 PR, 18 SD; and 16 (22.2 %) showed disease progression. In univariate analysis, only *GSTPI* was significantly related to response: patients with one or two Val alleles of *GSTPI* showed a significantly superior response rate of 89.2 % (33/37) compared with to 65.7% (23/35) in patients with *GSTPI Ile/Ile* genotypes, $p=0.017$. None of the other genotypes analyzed were significantly associated with treatment response.

Toxicity was recorded in each patient, no significant association between toxicity and genotype was found.

None patient stopped chemotherapy after serious hypersensitivity reaction to oxaliplatin during the infusion. Tolerance was satisfactory, with grade 3-4 toxicity observed in 25 % of patients for neutropenia, 1.4 % for thrombocytopenia, 5.6 % for diarrhea, 1.4 % for nausea or vomiting, 4.2 % mucositis and no grade 3-4 for anemia, table 5. None of the patients was reported to have died as a consequence of -related toxicity. Analysis of individual toxicity revealed an increased risk of female patients to develop neutropenia: 40.9% (9/13) but only 18.0% male patients (9/41) developed grade 3 to 4 neutropenia (OR, 2.27; 95% CI, 1.05– 4.94; P=0.039). Females suffered more delays in scheduled chemotherapy (68.2%) but not pronounced dosage reductions. In all, 50% of female patients required the use of granulocyte colony-stimulating factor whereas that use in male was lower (25.3%). Neurological toxicity Grade 1 to 2 was developed in 37.5% of patients, with only 4.2% reported as severe. Patients aged >70 years not exhibited poor tolerance for the regimen. Thirty two (44.4%) patients required a dose reduction in some cycle administered and sixteen patients showed a reduction after the first cycle.

DISCUSSION

Our results support the hypothesis that pharmacogenetic biomarkers may be useful to identify responders to chemotherapy in metastatic colorectal cancer. In patients treated with mFOLFOX6, the presence of *XPB-751 Lys/Gln* genotype was related to a higher PFS.

As the Gln allele could involve a lower DNA repair capacity²⁰, we could expect to find a correlation with the *Gln/Gln* genotype, but we can't prove or deny this hypothesis as, among other possible reasons, the number of homozygous is too small. Results could be refused or confirmed in a larger sample of patients.

Previous works have shown conflictive data about the role of *XPB-751*. On the one hand, Stoecklacher found the *Gln/Gln* group showed a 2.44-fold (95% CI: 1.09–5.44) increased risk of dying, whereas patients with the heterozygous genotype showed an intermediate risk compared to *XPB 751 Lys/Lys*⁷. The same polymorphism had no impact on PFS. In an earlier study by the same team, this polymorphism showed a similar effect on OS in 73 patients¹⁴. A further study of 166 patients with similar clinical characteristics indicates that this polymorphism also influenced PFS: *Lys/Gln* and *Gln/Gln* patients had a higher risk of progression compared with *Lys/Lys* patients⁸. A Spanish group presented better outcomes in terms of response and OS for the same genotype profile⁹. On the other hand, a positive predictive value has been assigned to this variant in other setting, lung cancer and cisplatin treatment.²¹

Two reasons may underlie this controversy: given the low allele frequency expected for the variant *Gln/Gln*, it's difficult to attribute a specific effect with statistical significance. And secondly, *XPB-751 Gln* has been proposed as a risk factor of developing cancer^{22,23}. Its potential rational arises from a defective DNA repair

capacity. This may be the reason of discrepancies in studies analyzing its predictive role: *XPD* may be a prognostic as well as a predictive biomarker, so the final effect on treatment may be overlapped by the contribution to the oncogenesis.

GSTP1-105Val seemed to relate with better RR and OS outcomes, but the relationship didn't find statistical significance in PFS. A better effect in predicting survival was found in combined analysis in patients without risk genotypes. A combined analysis of polymorphism in genes involved in NER and detoxification pathways may be more predictive and may contribute to the selection of patients who would benefit of oxaliplatin-based chemotherapy. Taken together, patients harboring *XPD Lys/Gln* and *GSTP-105Val*, had a longer PFS and OS. The rest of polymorphisms analyzed failed to demonstrate such a clinical association.

Activity of oxaliplatin may be conditioned by dose and elimination of the drug and by resistance mechanisms. Besides changes in the DNA-repair function, the rate of inactivation of the drug and therefore the exposure may also determine the activity of the drug in the tumor. The GST multigene family encodes enzymes that catalyze the conjugation of glutathione to electrophilic xenobiotics to inactivate them and facilitate their excretion from the body. This way, adducts by platinum compounds and consequent damage to DNA may be prevented. This has been proved in vitro previously²⁴. It has been demonstrated a decline in GSTP1 activity while increasing the number of *GSTP1-105Val* alleles²⁵. Moreover, the role of GSTP in detoxifying other drugs than alkylating is being explored. According to the NCI-60 Panel report based on their in vitro studies, GSTP1 polymorphisms are related to the cytotoxicity of several classes of drugs, specially topoisomerase inhibitors (as irinotecan, the third key drug in colorectal cancer), antimetabolites and the aforementioned alkylating agents²⁶. This experimental hypothesis was proved in the clinical setting in patients treated con

capecitabine-irinotecan or capecitabine alone, where the addition of irinotecan only caused benefit to the *GSTP1-105Val* patients²⁷. Our findings suggest a relationship between detoxification activity of oxaliplatin and activity so that the presence of one or both alleles of Val in *GSTP1-105* relates to response rate. Thus, a prolonged exposure of the tumor to oxaliplatin could explain better efficacy. This has been proposed and found by other authors²⁸. In addition of this, it has been found also an association of this polymorphism with neuropathy in other works, but we haven't reproduced this result.

Neuropathy is a complex trait from a genetic point of view, and there are many other factors involved beyond the exposure to the drug.

In a series of patients with advanced colorectal cancer treated with an oxaliplatin-based chemotherapy, McLeod et al did not find an association between *GSTP1* and *GSTM1* genotypes and the severity of oxaliplatin-related cumulative neuropathy²⁹. In another study, the *GSTP1-105Ile* allele was significantly more frequent in patients with cumulative peripheral neuropathy grade 3³⁰. Ruzzo et al. described 166 patients in which there were evidences of an association between the *GSTP1-105Val* allele and risk of developing neurotoxicity grade 3³¹ and afterwards, Lecomte and colleagues in a smaller cohort, found a significant association with this allele³².

Recent studies have reported that oxaliplatin can modify the voltage-dependent ionic channels mainly by altering the external surface membrane potential or by interference of oxalate with voltage-gated sodium channels resulting in acute or chronic neurotoxicity. Gamelin et al described that a minor haplotype in *AGXT* (polymorphism responsible of oxalate catabolism) to predict both toxicity³³. Furthermore, any genes or proteins involved in the transport of platinum into or out of cells could play a role in neurotoxicity developed, such as the copper transporters *CTR1*, *ATP7A* and *ATP7B*³⁴.

DNA repair gene polymorphisms involve different activity and earlier works have found controversial associations among NER or BER system activities and efficacy of platinum compounds.

XRCCI and *ERCCI* are both involved in the repair of DNA damage and hence functional variants of these genes are candidate predictive markers for response to oxaliplatin. Several groups have reported that patients with *ERCCI-118TT* or *CT* genotype have better response rate and OS than *CC* patients^{9,12,35}. However, in other papers, patients harbouring T allele have associated to a worse survival with the same treatment^{7,8}. Regarding *XRCCI*, presence of the wild type allele in colorectal tumoural tissue was also associated with better survival and response to oxaliplatin, but, in recent studies in advanced colorectal cancer and gastric cancer patients, *XRCC1* genotype did not predict outcome after oxaliplatin treatment^{8,9}. In our work, we have not found an association with statistically significance.

Main limitation of this study is its retrospective design. We have tried to show our findings in patients under the usual clinical practice and we don't pretend to compare groups. Retrospective studies are useful to identify potential biomarkers that should be validated in a more controlled assay, and even in this case, it wouldn't have to be necessarily prospective, so that other authors and consensus groups have proposed to accept retrospective studies of randomized clinical trials as evidence enough to validate prognostic or predictive biomarkers. That's the case of K-RAS in panitumumab³⁶ or cetuximab trials, or EGFR mutations (del19 and L858R) in gefitinib³⁷. Both cases have been included in the labels of such drugs by the European Medicines Agency after reviewing retrospectively clinical trials. By the other hand, we have included patients in first and second line, but the aim of the analysis is to see if the polymorphism affects the clinical outcomes independently of the line used. The effect of the variants pointed out

in the paper is consistent in both lines but we couldn't find a statistical significance in every group because of the small size.

Response rate is high conditioned by the use of antibodies (cetuximab and bevacizumab added to m-FOLFOX). But we have found that XPD Lys/Gln is a positive predictive factor for mFolfox and also for mFolfox -antibody treatments. In both cases, we have found a statistical significance, but the magnitude of the effect is less in the antibody subgroup. GSTP1 Val correlated with response in the whole group, and analyzed separately, we found the same result but it was statistically significant only in the mFolfox subgroup (n=37) and it showed only a trend in the mFolfox-antibody subgroup (n=35). Unfortunately, by the time of study K-RAS determination was not mandatory, so we can't establish an association between response to cetuximab-based treatments and biomarkers. In the case of bevacizumab, no biomarker has been validated to predict efficacy. So, we can't establish the contribution of every antibody to the outcomes, or search an association according to the genotype groups.

In conclusion, polymorphisms in genes of DNA repair pathways can be a useful tool to identify patients who benefit most from treatment with oxaliplatin for colorectal cancer. This should be validated in prospective and/or randomized clinical trials.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Fondo de Investigación Sanitaria; Instituto de Salud Carlos III, PI061712), from Fundación Ramón Areces and from Fundación Barrié de la Maza (Programa DIANA).

Executive summary

- We evaluated the impact of genetic polymorphism involved in drug metabolism, DNA repair, nucleotide excision repair, base excision repair in clinical outcomes and survival on colorectal cancer treatment.
- Only *GSTP1* was significantly related to response, none of the other genotypes analyzed were significantly associated with treatment response.
- The *XPB-751 Lys/Gln* genotype is associated with increased survival.
- A combined genotype analysis of *GSTP-Val* and *XPB-751 Lys/Gln* seems to predict the risk of progression.
- The genomic polymorphism *XPB-751* and *GSTP1* may be useful in predicting time to progression and clinical outcome of colorectal cancer in patients who receive 5-FU/oxaliplatin chemotherapy. This should be validated in prospective and/or randomized clinical trials.

Table 1: Baseline characteristics of the 72 patients

	n	%
Age, years		
Median	66.5	
Range	32-80	
Sex		
Male	50	69.4%
Female	22	30.6%
PS score (ECOG)		
0-1	67	93.1%
2	5	6.9 %
Primary tumour		
Colon	29	40.3%
Sigma	18	25.0%
Rectum	25	34.7%
Line of treatment		
First line	42	58.3%
Second line	30	41.7%
Chemotherapy regimens		
Folfox	37	51.4%
Folfox-Cetuximab	25	34.7%
Folfox-Bevacizumab	10	13.9%
Number of metastatic sites		
1	9	12.5%
2	26	36.1%
>2	37	51.4%
Outcome		
Complete response	5	7.0%
Partial response	33	45.8%
Stable response	18	25.0%
Disease progression	16	22.2%

Table 2: Univariate analysis of the polymorphisms genetic in patients treated with fluorouracil-oxaliplatin regimen

Markers	PFS (months) Median (95% CI)	p ^a
GSTP1 Ile105Val		
Ile/Ile	8 (5.8 – 10.2)	0.067
Ile/Val + Val/Val	11 (8.0 – 13.9)	
XPB751		
Lys/Lys	8 (5.8 – 10.2)	0.019
Lys/Gln	16 (9.2 – 22.7)	
Gln/Gln	10 (6.1 – 13.9)	
XRCC1 Arg399Gln		
A/A	6 (1.3 – 10.6)	0.674
G/A	10 (7.8 – 12.1)	
G/G	12 (7.4 – 16.5)	
ERCC1 Asn118Asn		
C/C	9 (0.0 – 18.7)	0.988
C/T	10 (7.9 – 12.0)	
T/T	10 (5.3 – 14.6)	
MTHFR C677T		
C/C	9 (7.5 – 10.4)	0.523
C/T	11 (3.8 – 18.1)	
T/T	11 (5.1 – 16.8)	
MTHFR A1298C		
A/A	10 (9.7 – 11.1)	0.573
A/C	10 (7.8 – 12.6)	
C/C	13 (2.2 – 25.4)	
EGFR (CA)n repeat *		
S/S	10 (5.7 – 14.2)	0.953
S/L	9 (7.0 – 10.9)	
L/L	10 (8.4 – 11.5)	

TS 1494del6

-6bp/-6bp	18 (5.5 – 30.4)	0.163
+6bp/-6bp	10 (6.4 – 13.5)	
+6bp/+6bp	10 (7.2 – 12.7)	

TS 5'UTR VNTR

2R/2R,2R/3C,3C/3C	10 (8.1 – 11.8)	0.889
2R/3G,3C/3G,3G/3G	9 (7.3 – 10.6)	

Abbreviations: CI=confidence interval. Kaplan-Meier estimates of PFS. ^a Difference of the estimates tested using the long-rank test.

Table 3: Relationship between efficacy (Responder and PFS) and GSTP1 or XPD genotypes according to the use of antibodies

	Gene polymorphisms	Folfox	Folfox-Antibody
Responder	GSTP1 polymorphism:		
	Ile/Ile	14 (66.7%)	9 (64.3%)
	Ile/Val + Val/Val	16 (100%)	17 (81.0%)
	XPD751 polymorphism:		
	Lys/Lys	10 (77.1%)	10 (66.7%)
	Lys/Gln	14 (82.3%)	15 (93.7%)
	Gln/Gln	6 (85.7%)	1 (25.0%)
PFS 95% CI	GSTP1 polymorphism:		
	Ile/Ile	7 (4.7 – 9.2)	9 (5.3 – 12.6)
	Ile/Val + Val/Val	18 (14.1 – 21.8)	9 (6.3 – 11.4)
	XPD751 polymorphism:		
	Lys/Lys	9 (5.4 – 12.5)	7 (4.1 – 9.8)
	Lys/Gln	18 (11.9 – 24.1)	11 (1.8 – 20.1)
	Gln/Gln	10 (6.4 – 13.5)	5 (0.0 – 13.8)

Table 4: Association of baseline characteristics and germline genetic variables according to response.

Genes and polymorphisms	Responder %	Non-responder %	P
	(CR+PR+SD)	(PD)	
Age (years)			
≤66.5	31 (86.1)	5 (13.9)	0.09
>66.5	25 (69.4)	11 (30.6)	
PS score			
0-1	53 (79.1)	14 (20.9)	0.32
2	3 (60.0)	2 (40.0)	
Number of metastatic sites			
1	6 (66.7)	3 (33.3)	0.48
2	22 (84.6)	4 (15.4)	
>2	28 (75.7)	9 (24.3)	
Chemotherapy regimens			
Folfox	30 (81.1)	7 (18.9)	0.49
Folfox-antibody	26 (74.3)	9 (25.7)	
GSTP1 Ile105Val			
Ile/Ile	23 (65.7)	12 (34.3)	0.02
Ile/Val + Val/Val	33 (89.2)	4 (10.8)	
XRCC1 Arg399Gln			
A/A	9 (90.0)	1 (10.0)	0.61
G/A	22 (75.9)	7 (24.1)	
G/G	25 (75.8)	8 (24.2)	

XPB751

Lys/Lys	20 (71.4)	8 (28.6)	0.14
Lys/Gln	29 (87.9)	4 (12.1)	
Gln/Gln	7 (63.6)	4 (36.4)	

ERCC1 Asn118Asn

C/C	8 (72.7)	3 (27.3)	0.77
C/T	29 (76.3)	9 (23.7)	
T/T	19 (82.6)	4 (17.4)	

MTHFR C677T

C/C	21 (80.8)	5 (19.2)	0.67
C/T	29 (78.4)	8 (21.6)	
T/T	6 (66.7)	3 (33.3)	

MTHFR A1298C

A/A	31 (83.8)	6 (16.2)	0.39
A/C	21 (70.0)	9 (30.0)	
C/C	4 (80.0)	1 (20.0)	

EGFR (CA)n repeat *

S/S	22(73.3)	8 (26.7)	0.54
S/L	20(76.9)	6 (23.1)	
L/L	14 (87.5)	2 (12.5)	

TS 1494del6

-6bp/-6bp	6(66.7)	3 (33.3)	0.68
+6bp/-6bp	24 (80.0)	6 (20.0)	
+6bp/+6bp	26 (78.8)	7 (21.2)	

TS 5'UTR VNTR

2R/2R,2R/3C,3C/3C	35 (77.8)	10 (22.2)	1.00
2R/3G,3C/3G,3G/3G	21 (77.8)	6(22.2)	

Abbreviations: GSTP1, Glutathione S-transferase tipe I, XPD, Xeroderma pigmentosus group D, XRCC1, x-ray cross complementing group 1; ERCC1, excision repair cross complementing group 1; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; EGFR, epidermal growth factor receptor; TS, thymidylate synthase; UTR, untranslated región; VNTR, variable number tandem repeat.

* S: <17 CA repeats; L: 17 or >17 CA repeats

Table 5: Toxicity during the first cycle and all cycles

Toxicity	First cycle						All cycles					
	Grade 0-1		Grade 2		Grade 3-4		Grade 0-1		Grade 2		Grade 3-4	
	N0.	%	N0.	%	N0.	%	N0.	%	N0.	%	N0.	%
Anemia	68	94.4	3	4.2	1	1.4	60	83.3	11	15.3	1	1.4
Leukopenia	66	91.7	6	8.3	0	0.0	58	80.5	13	10.1	1	1.4
Neutropenia	55	76.4	10	13.9	7	9.7	32	44.4	22	30.6	18	25.0
Thrombocytopenia	72	100.0	0	0.0	0	0.0	70	97.2	1	1.4	1	1.4
Nausea/vomiting	68	94.4	4	5.6	0	0.0	65	90.3	6	8.3	1	1.4
Diarrhea	64	88.9	6	8.3	2	2.8	57	79.2	11	15.3	4	5.5
Mucositis	69	95.8	2	2.8	1	1.4	62	86.1	7	9.7	3	4.2
Neurological	72	100.0	0	0.0	0	0.0	64	88.9	5	6.9	3	4.2

Figure 1

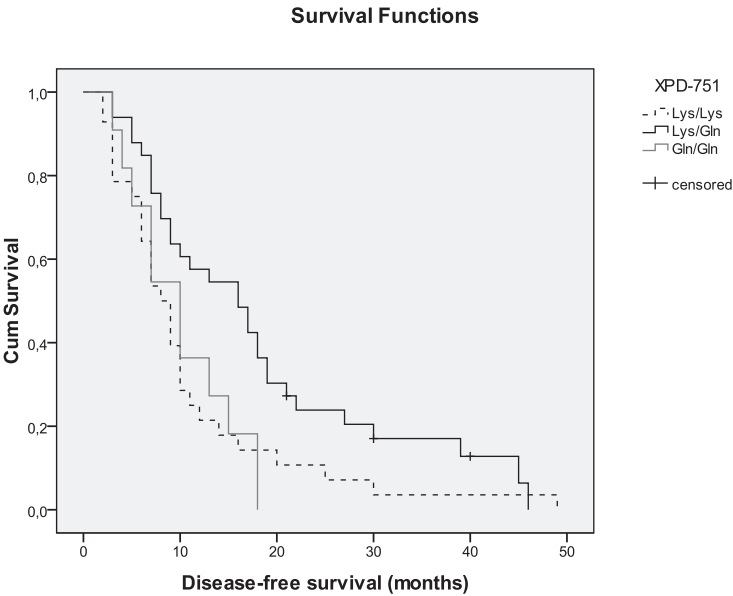


Figure 1

Disease-free Survival of patients by XPD-571 genotypes, $p=0.019$

Figure 2

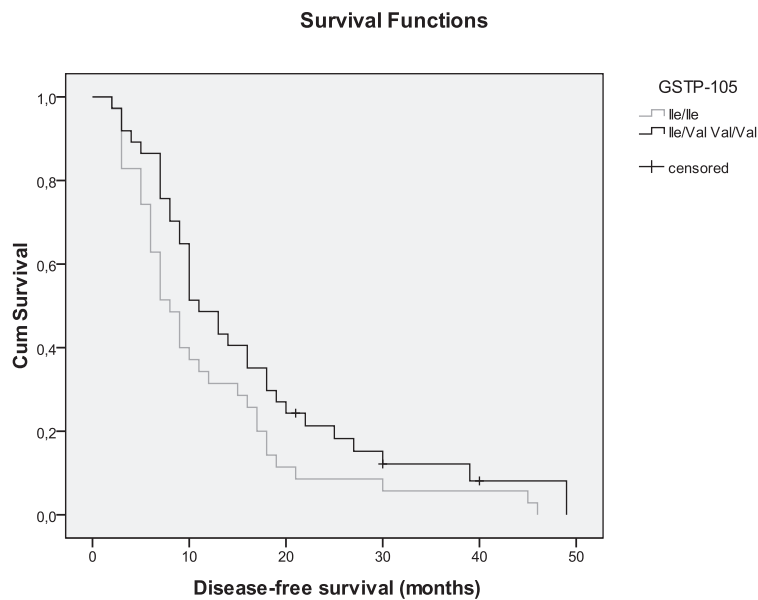


Figure 2

Disease-free Survival of patients by GSTP-105 genotypes, p=0.067

Figure 3

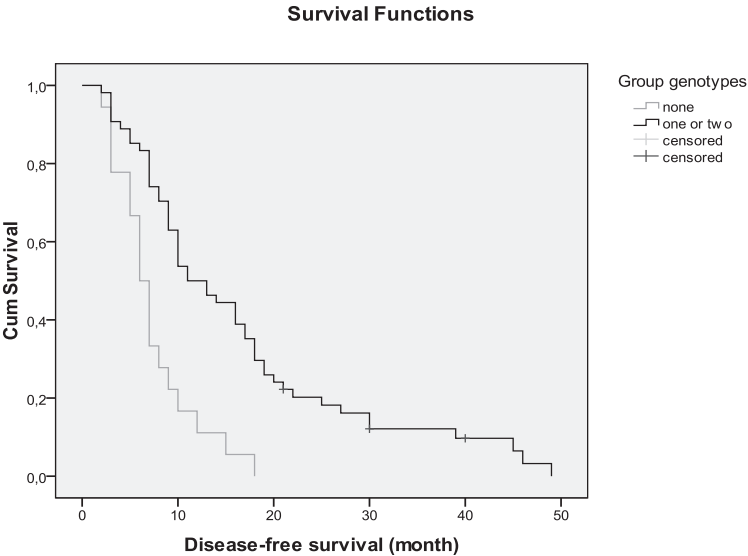


Figure 3

Disease-free Survival of patients harboring none favorable genotype: 6 months (95% CI, 4.6 – 7.4) compared to 11 months (95% CI, 7.4 – 14.6)) with one or two favorable genotypes (*XPD-571 Lys/Gln* and/or *GSTP1-Val*)

Figure 4

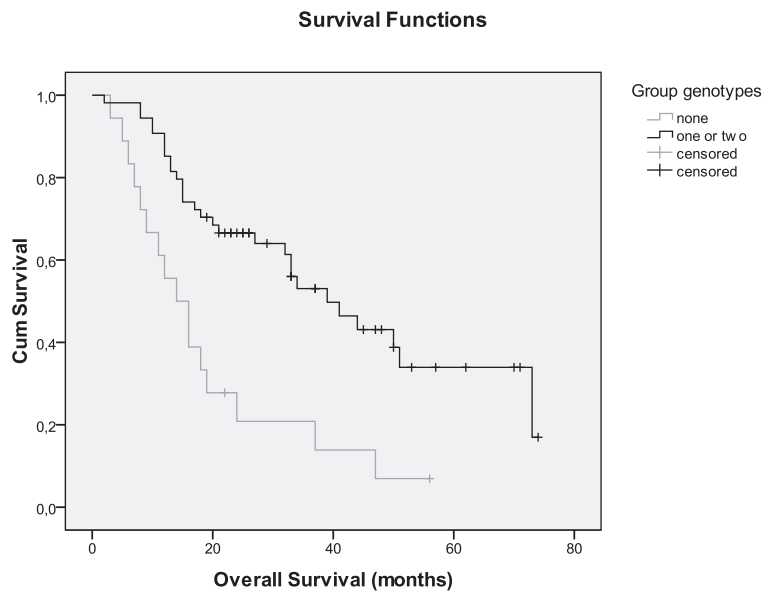


Figure 4:

Overall survival of patients harboring none favorable genotype: 14 months (95% CI, 8.5 – 19.5) and patients with one or two favorable genotypes (*XPD-571 Lys/Gln* and/or *GSTP1-Val*): 39 months (95% CI, 26.1 – 51.9) $p<0.001$

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:

* of interest

** of considerable interest

¹ Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005;365(9454):153-165.

² Kweekel DM, Gelderblom H, Guchelaar HJ et al. Pharmacology of oxaliplatin and the use of pharmacogenomics to individualize therapy. *Cancer Treat Rev* 2005;31:90-105.

³ Tournigand C, Andre T, Achille E, et al: FOLFIRI followed by 6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 22:229-237, 2004

⁴ Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, et al.Phase III randomised trial of FOLFIRI versus 4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4866-4875.

⁵ De Gramont A, Figier A, Seymour M,et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;18: 2938-2947.

⁶ Le Morvan V, Smith D, Laurand A,et al. Determination of ERCC2 Lys751Gln and GSTP1 Ile105Val gene polymorphism in colorectal cancer patients: relationships with treatment outcome. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 1693-1703.

⁷ Stoecklacher J, Park DJ, Zhang W,et al. A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 344-54.

*** important study that explores the relationship between GSTP1 and efficacy of oxaliplatin.**

⁸ Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F,et al. Pharmacogenomic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line folfox-4 chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007, 25: 1247-1254.

*** This is a relevant prospective trial evaluating a panel of pharmacogenetic biomarkers in relation with efficacy and toxicity of mFOLFOX metastatic colorectal patients.**

⁹ Pare L, Marcuello E, Altes A, et al. Pharmacogenomic prediction of clinical outcome in advanced colorectal cancer patients receiving oxaliplatin/ 5-fluorouracil as first-line chemotherapy. *Br J Cancer* 2008; 99: 1050-1055.

*** this paper reproduces most of previous findings in the frame of mFOLFOX treatments.**

¹⁰ Reed E. ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. *Clin Cancer Res* 2005;11: 6100-6102

¹¹ Viguier J, Boige V, Miquel C, et al. ERCC1 codon 118 polymorphism is a predictive factor for the tumour response to oxaliplatin/5-fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6212-6217.

¹² Moreno V, Gemignani F, Landi S, et al. Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2101-2108.

¹³ Stoecklacher J, Ghaderi V, Iobal S, et al. A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2001;21: 3075- 3079.

¹⁴ Park DJ, Stoecklacher J, Zhang W, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lenz HJ. A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8654-8.

****This paper states the predictive role of XPD polymorphisms to oxaliplatin.**

- ¹⁵ Etienne MC, Ilc K, Formento JL, et al. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: relationships with 5-fluorouracil sensitivity. *Br J Cancer* 2004; 90: 526–34
- ¹⁶ Adamo V, Franchina T, Adamo B, et al. Role of MTHFR polymorphism as predictive markers of acute toxicity during 5-fluorouracil based chemotherapy for colorectal cancer: preliminary data. *J Clin Oncol* 2008;26, 20 suppl abstract 15036.
- ¹⁷ Raida M, Schwabe W, Hausler P, et al Prevalence of a Common Point Mutation in the Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Gene within the 5'-Splice Donor Site of Intron 14 in Patients with Severe 5-Fluorouracil (5-FU)- related Toxicity Compared with Controls. *Clinical Cancer Research* 2001; 7: 2832-9
- ¹⁸ Lenz H-J, Park DJ, Zhang W, et al. A multivariate analysis of genetic markers for clinical response to 5-FU/oxaliplatin chemotherapy in advanced colorectal cancer. In American Society of Clinical Oncology. Orlando, FL (abstr. 513): ASCO proceedings.
- ¹⁹ Balboa E, Duran G, Lamas MJ, et al. Pharmacogenetic analysis in neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer: high incidence of somatic mutations and their relation with response. *Pharmacogenomics*. 2010 Jun; 11(6):747-61.
- ²⁰ Spitz MR, Wu X, Wang Y, et al. Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res* 2001;61 : 1354-1357.
- ²¹ Quintela-Fandino M, Hitt R, Medina PP, et al. DNA-repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome among patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based induction chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2006 10;24(26):4333-9
- ²² Gao W, Romkes M, Zhong S, et al. Genetic polymorphisms in the DNA repair genes XPD and XRCC1, p53 gene mutations and bladder cancer risk. *ONCOL Rep*. 2010 Jul; 24(1):257-62.
- ²³ De Ruyck K, Szaumkessel M, De Rudder I, et al. Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk. *Mutat Res*. 2007 Jul 28; 631(2):101-10.
- ²⁴ Ban N, Takahashi Y, Takayama T, et al. Transfection of glutathione S-transferase (GST)-pi antisense complementary DNA increases the sensitivity of a colon cancer cell line to adriamycin, cisplatin, melphalan, and etoposide. *Cancer Res*. 1996 Aug 1; 56(15):3577-82.
- ²⁵ Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*. 1998 Feb; 19(2):275-80.
- ²⁶ Le Morvan V, Bellott R, Moisan F, Mathoulin-Pélissier S, Bonnet J, Robert J. Relationships between genetic polymorphisms and anticancer drug cytotoxicity vis-à-vis the NCI-60 panel. *Pharmacogenomics*. 2006 Sep; 7(6):843-52.
- ²⁷ Kweekel DM, Koopman M, Antonini NF, et al. GSTP1 Ile105Val polymorphism correlates with progression-free survival in MCRC patients treated with or without irinotecan: a study of the Dutch Colorectal Cancer Group. *Br J Cancer*. 2008; 99(8):1316-21.
- ²⁸ Zarate R, Rodríguez J, Bandres E, et al. Oxaliplatin, irinotecan and capecitabine as first-line therapy in metastatic colorectal cancer (mCRC): a dose-finding study and pharmacogenomic analysis. *Br J Cancer*. 2010; 102(6):987-94
- ²⁹ McLeod HL, Sargent DJ, Marsh S, et al. Pharmacogenetic analysis of systemic toxicity and response after 5-fluorouracil (5FU)/CPT-11, 5FU/oxaliplatin (oxal), or CPT-11/oxal therapy for advanced colorectal cancer (CRC): results from an intergroup trial [Abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003;22:253
- ³⁰ Henderson CJ, McLaren AW, Moffat GJ, Bacon EJ, Wolf CR. Pi-Class glutathione S-transferase: regulation and function. *Chem Biol Interact* 1998;111–2:69–82.

-
- ³¹ Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F et al. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line -4 chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2007 Apr 1; 25(10):1247-54.
- ³² Lecomte T, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Lloria MA. Glutathione S-Transferase P1 Polymorphism (Ile¹⁰⁵Val) Predicts Cumulative Neuropathy in Patients Receiving Oxaliplatin-Based Chemotherapy. *Clin Cancer Res* May 15, 2006 12:3050-3056.
- ³³ Gamelin E, Gamelin L, Bossi L, Quasthoff S. Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures. *Semin Oncol* 2002;29:21-33
- ³⁴ Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:14298–302.
- ³⁵ Martínez-Balibrea A, Abad A, Aranda E, et al. Pharmacogenetic approach for capecitabine or 5-fluorouracil selection to be combined with oxaliplatin as first-line chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2008;**44**:1229–1237.
- ³⁶ Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type Kras is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26 (10)1626-34.
- ³⁷ Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for No-small cell lung cancer with Mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010;362;2380-8.

Artículo 2: The value of genetic polymorphisms to predict clinical response and toxicity in metastatic colorectal patients with irinotecan–based regimens.

Lamas MJ, Duran G, Balboa E, Bernardez B, Candamio S, Gallardo E, Mosquera A, Lopez R, Carracedo A, Barros F.

Cancer Chemotherapy and Pharmacology

Research Article DRAFT Nov 2010

ABSTRACT/ RESUMEN

Los polimorfismos de los genes implicados en el metabolismo o dianas de 5FU e irinotecan se han propuesto como posibles predictores de la eficacia y toxicidad de FOLFIRI. En el caso de UGT1A1, varios estudios y metanálisis han encontrado el papel predictivo del alelo *28 de neutropenia y diarrea graves pero hay controversia si con el empleo de dosis moderadas o bajas de irinotecan como en el caso de FOLFIRI (180 mg/m² iv cada 2 semanas) se reproduce este efecto. Hemos estudiado la posible utilidad de UGT1A1*28, *93 y *60, de TS 5'UTR VNTR, TS 3'UTR -6bp, y otras variantes genéticas previamente relacionadas con estos fármacos en el tratamiento del cáncer colorrectal metastático con FOLFIRI en un contexto de práctica clínica asistencial. La frecuencia de *28/*28 fue del 8%, y *1/*28 del 29%, coincidente con la literatura. No se han encontrado asociaciones significativas con toxicidad grave ni supervivencia. Un 32% de los pacientes requirieron reducciones de dosis de más del 20%, el 28.7% de los pacientes requirieron el uso de factor estimulante de colonias para mantener la intensidad de dosis. Tampoco se relacionan de forma significativa estas dos situaciones con UGT1A1*28. Como conclusión, el impacto del riesgo mayor de toxicidad atribuido al UGT1A1*28 por FOLFIRI puede quedar compensado en la práctica clínica habitual por la reducción de dosis, el uso de factor estimulante de colonias, o las instrucciones al paciente de manejo precoz de diarrea tóxica.

		UGT1A1					
		6/6		6/7		7/7	
		n	%	n	%	n	%
Use G-CSF	Yes	10	(17.0)	12	(37.5)	6	(66.7)
	No	49	(83.0)	20	(62.5)	3	(33.3)
Grade diarrhea	G.0-2	50	(84.7)	29	(90.6)	9	(100.0)
	G.3-4	9	(15.3)	3	(10.4)	0	(0.0)
Grade neutropenia	G.0-2	51	(86.4)	23	(71.8)	8	(88.9)
	G.3-4	8	(13.6)	9	(28.2)	1	(11.1)
Dose	100%	41	(69.5)	19	(59.4)	4	(44.4)
	80-75%	16	(27.1)	11	(34.4)	4	(44.4)
	<75%	2	(3.4)	2	(6.2)	1	(1.2)

Dose intensity (DI)

Thirty-seven (36.6%) of the 101 patients required dose reduction of irinotecan and/or 5-FU owing to toxicity, mainly neutropenia and diarrhea.

The median number of cycles at the time when dose reduction was first required was 5.5 (range, 2–11 cycles). In 32 (31.7%) of the 101 patients required dose reduction to 80-75% and 5 patients who received a reduced dose of irinotecan less than 75%.

Patients aged >70 years not exhibited poor tolerance for the regimen and the females not suffered more delays in scheduled chemotherapy.

Efficacy

Objective response (CR_PR) was observed in 34 of 101 assessable patients (33.6%) and included 7 CRs (6.9%) and 27 PRs (26.7%). SD was obtained in 40 patients (39.6%) and

The value of genetic polymorphisms to predict clinical response and toxicity in metastatic colorectal patients with irinotecan-based regimens.

Lamas MJ¹, Duran G¹, Balboa E², Bernardez B¹, Candamio S³, Gallardo E³, Mosquera A¹, Lopez R³, Carracedo A^{2,4}, Barros F².

¹Oncology Pharmacy Unit, Complejo Hospitalario Universitario of Santiago (CHUS), Choupana S/N, Santiago de Compostela 15706, Spain.

² Molecular Medicine Unit, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Choupana S/N, Santiago de Compostela 15706, Spain.

³Department of Medical Oncology, CHUS, Choupana S/N, Santiago de Compostela 15706, Spain.

⁴ Genomic Medicine Group-CIBERER, University of Santiago de Compostela, Calle San Francisco S/N, Santiago de Compostela 15705, Spain.

Keywords: Polymorphisms, pharmacogenetic, toxicity, clinical outcome, colorectal cancer, irinotecan.

Introduction

Irinotecan is approved for use in m-CRC. The most usual combination with infusional 5-fluorouracil and leucovorin (FOLFIRI) has become a key treatment for first or second-line treatment of metastatic colorectal cancer. Best benefit is obtained when both, FOLFOX (oxaliplatin 85 mg/m² + leucovorin 200 mg/m² + 5FU 400 mg/m² bolus + infusional 5FU 2.400 mg/m² in 46 hours) and FOLFIRI (irinotecan 180 mg/m² + leucovorin 200 mg/m² + 5FU 400 mg/m² bolus + infusional 5FU 2.400 mg/m² in 46 hours) are administered independently of the order¹. Monoclonal antibodies, bevacizumab and cetuximab, added to one or other chemotherapy regimen, increase benefit although their role is not well established yet^{2, 3, 4, 5, 6, 7}. Irinotecan efficacy is activated by carboxyesterases to form the active metabolite SN-38. The major route of SN-38 elimination is via glucuronidation by hepatic UGT1A enzymes⁸.

UGT1A1*28 is a common allele with seven TA repeats in the TATA box of the UGT1A1 promoter compared with the wild-type allele, which has six TA repeats (UGT1A1*1). These are named *1 (the "wild" sequence of (TA)6TAA) and *28 (with an extra TA repeat or (TA)7TAA). UGT1A1*28 has been shown to be associated with decreased SN-38 glucuronidation in humans⁹. The association between the UGT1A1*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia has been extensively studied. Some of these studies found that UGT1A1*28/*28 patients had an elevated risk of neutropenia compared with those carrying UGT1A1*1 allele(s)^{10, 11, 12}. The U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 2005 recommended that Pfizer amend the package insert of irinotecan to warn of the elevated risk of neutropenia for UGT1A1*28/*28 patients. Although initial studies found UGT1A1*28 genotype to be strongly associated with risk of toxicity, results of subsequent studies^{13,14} were inconsistent. In a meta-analysis carried out in 2007, which included 878 patients, the authors found that the irinotecan dose delivered modulated the association between UGT1A1*28 genotype and irinotecan-induced hematologic toxicity and that the interaction was clinically important only at higher irinotecan doses¹⁵. At lower irinotecan doses, factors other than UGT1A1*28 genotype, either genetic or non genetic, seemed likely to determine a patient's risk of hematologic toxicity, whereas at higher drug doses, UGT1A1*28 genotype appeared to be an important determinant. More recently, a new meta-

analysis based on a large sample size (1,998 patients) indicates that UGT1A1*28/*28 patients are at an increased risk of neutropenia not only if they are being treated with medium (RR, 2.00) and high doses (RR, 7.22) of irinotecan but also if they are being treated with low doses (RR, 2.43; 80-145 mg/m²)¹⁶. Diarrhea is another important side effect related to irinotecan administration. Recently, Hu et al proposed that UGT1A1*28/*28 patients were at an increased risk of diarrhea at medium (RR, 1.79; 95% CI, 1.08-2.97) or high doses (RR, 2.32; 95% CI, 1.25-4.28) of irinotecan, but not at low doses (RR, 0.65; 95% CI, 0.27-1.58)¹⁷.

The antitumor effect of 5-FU has ascribed to the competitive inhibition of thymidylate synthase (TS). Level of TYMS expression¹⁸ and the degree of activity of Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)¹⁹ have been associated with treatment effectiveness and toxicity, although the latter is mainly related to dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) activity²⁰. The polymorphic tandem repeat (VNTR) in TS 5'-untranslated region (5'UTR) (rs34743033) consists of either two or three 28-bp repeated sequences (2R or 3R alleles). 3R alleles have shown upregulation of TS protein levels, and this correlates with clinical outcomes and survival (9, 10). A G/C polymorphism (rs2853542) within the 3R VNTR allele was found to determine two additional alleles (3G or 3C) at this locus. The 3G allele has been associated with higher reported gene activity. The combination of this single nucleotide polymorphism (SNP) and VNTRs allows the definition of 2 groups of genotypes: TS high expression (*2R/*3G; *3C/*3G; *3G/*3G) and TS low expression related (*2R/*2R; *2R/*3C; *3C/*3C)²¹. Time to progression and OS were significantly improved in low expression genotypes²². Another TS polymorphism described (TS 1494del6) is a 6-bp insertion/deletion (6+/6-) in the 3'UTR (rs16430). 6+/6+ genotypes may be associated to decrease chemosensitivity to fluorouracil²³ (13). Over 80% of 5-FU is inactivated by dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD). DPD deficiency appears to be a genetic disorder arising from multiple polymorphisms in the DPYD gene resulting in decreased enzyme activity. Approximately 50% of all known inactivating alleles of DPYD consist of a guanidine (G) to adenine (A) transition at an invariant GT splice donor site flanking exon 14 (IVS14+1G>A) (rs3918290). This allele, DPYD*2A, has been associated with severe 5-FU related toxicity²⁴.

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) catalyzes 5,10-MTHF to 5

methylentetrahydrofolate. The two most common polymorphisms of clinical significance are *MTHFR* A1298C (rs1801131) and C677T (rs 1801133), both could be used as predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy as these mutations are related to a decreased enzyme activity, accumulation of 5,10-MTHF and increased inhibition of TS²⁵.

In spite of the results afore mentioned, UGT1A1 genotyping is not yet a routine test in clinical practice. The usual practice of dose reductions or use of filgrastim may hide the need of previous UGT1A1 test. DPYD, *MTHFR* and *TYMS* polymorphisms keep on being exploratory biomarkers in relation with 5-FU treatments.

We have selected a comprehensive panel of SNPs to use in patients with newly diagnosed metastatic colorectal cancer who could receive FOLFOX or FOLFIRI along their illness. We are trying to evaluate the impact of these known polymorphisms in real practice conditions in order to identify useful tools to improve mCRC patient management. In this work, we focus our interest in biomarkers related to FOLFIRI.

Material and method

All patients in this study had histologically confirmed diagnosis of advanced stage adenocarcinoma of the colon or rectum, with a performance status of 0 to 2 according to the WHO scale. These patients were treated with 5-FU/irinotecan based chemotherapy. Irinotecan (180 mg/m^2) was administered by intravenous (i.v) 2h infusion concurrent with leucovorin (200 mg/m^2) and immediately followed by 5-FU (400 mg/m^2) given as a i.v bolus on day 1 and followed by 5-FU (2400 mg/m^2) as a continuous 46h infusion. The sums of irinotecan doses and of 5-FU doses administered during the cycles of FOLFIRI therapy were captured, as well as number of cycles, total cumulative drug dose and description of treatment delays and/or reductions. Treatment was repeated every 2 weeks until progression or unacceptable adverse reactions. All toxicities were graded according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria CTC v3.0. For each patient, we recorded the maximum observed toxicity grade (anaemia, neutropenia, thrombocytopenia, diarrhea, neurotoxicity and nausea or vomiting). Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) support was allowed if neutropenia compromised treatment schedule. We evaluated response according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors criteria (RECIST) by CT scan. Objective response was evaluated after 3 cycles of treatment and every 3 months. Response was classified as complete response (CR), partial response (PR), stable disease (SD) or progressive disease (PD) according to the RECIST criteria. For this study, patients with CR or PR were classified as responders, and patients with SD or PD were classified as non-responders. Relevant clinical data were obtained from clinical records (gender, age, performance status, number of metastatic sites, colon vs rectum involvement). The local ethics committee approved the pharmacogenetic study protocol and all subjects signed an informed consent before participating in the study. Clinical data were obtained by retrospective chart review.

The primary end-point is to find out if the pharmacogenetic test before FOLFIRI treatment in the clinical practice may predict toxicity and in this case incorporating it to routine practice in our centre.

Secondary end-points include evaluating the utility of other related biomarkers to predict efficacy in terms of objective responses, Progression Free Survival (PFS) and Overall Survival (OS), and also toxicity.

Molecular analyses

DNA was extracted from peripheral blood samples collected from 72 colorectal cancer patients on day 1 of treatment.

The *TS* promoter region polymorphism (5'VNTR) was analyzed by sequencing. The *TS* 1494del6 polymorphism and *EGFR* (CA)_n repeat polymorphism were analyzed by fluorescent fragment analysis. Polymorphisms at *MTHFR*, *XRCC1*, *ERCC1* and *DPYD* were analyzed by SnapShot method. Conditions and techniques have been recently described in a paper of our group²⁶.

Statistical Analysis: The purpose of this analysis was to evaluate the association between the polymorphism and demographics data, response to chemotherapy and survival time. The χ^2 test was used to compare the observed genotype distributions with those expected by the Hardy-Weinberg equilibrium. The χ^2 and Fischer's exact test were used for the categorical variables to evaluate the association of the expression of genetic markers and the response to chemotherapy. In addition binomial logistic regression methods were used to determine the strength of influence of the selected SNPs upon response prediction and coded with dummy indicator variables. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated for each genotype compared with the homozygous for the major allele (the allele with greater frequency among controls), which were set as the reference genotype.

Each genotype was independently analyzed, and a combined analysis was planned if multiple genotypes showed a significant association. The association between genotypes and PFS was estimated by computing hazard ratios and their 95% CI from Cox proportional hazards regression models. PFS curves were estimated using the Kaplan-Meier method and the log-rank test was used to compare the curves. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Analyses were done using SPSS version 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Results

Patient characteristics

Baseline patient characteristics are listed in Table 1. Median age was 67 years (range, 30–87 years). The number of patients who received FOLFIRI as first-line chemotherapy was 67 (66.3%) and second-line was 34 (33.7%).

Thirty-eight patients had adjuvant chemotherapy, fifteen patients which was 5-FU plus Leucovorin or oral fluoropyrimidine and twenty-three patients had received oxaliplatin (FOLFOX). Sixty-four patients (63.4%) received the original full-dose FOLFIRI. In 5 patients, irinotecan was reduced to dose of less 75%.

	n	%
Age, years		
Median	67	
Range	30-87	
Sex		
Male	64	63.4%
Female	37	36.6%
PS score (ECOG)		
0-1	96	93.1%
2	5	6.9%
Primary tumour		
Colon	40	39.6%
Sigma	25	24.8%
Rectum	36	35.6%
Line of treatment		
First line	67	66.3%
Second line	34	33.7%
Chemotherapy regimens		
Folfiri	33	32.7%
Folfiri-Cetuximab	6	5.9%
Folfiri-Bevacizumab	58	57.4%
Irinotecan-Cetuximab	4	4.0%
Number of metastatic sites		
1	14	13.8%
2	42	41.6%
>2	45	44.6%

Outcome

Complete response	7	6.9%
Partial response	27	26.7%
Stable response	40	39.6 %
Disease progression	27	26.8%

Safety

The median number of cycles administered was 4 (range, 3–12 cycles). Toxicity in all patients is shown in Table 2.

Tolerance was satisfactory, with grade 3-4 toxicity observed in 18.9 % of patients for neutropenia, 11.9 % for diarrhea, 4 % for leukopenia, 1 % mucositis, 4% for anaemia and no grade 3-4 for thrombocytopenia and nausea or vomiting. Five patients had febrile neutropenia. Toxicity was recorded in each patients, and we haven't found any significant association between toxicity and genotype. There were no treatment-related deaths. Although almost all treatments were conducted in an outpatient setting, two patients required admission because of toxicity. Grade 3/4 diarrhea occurred in twelve patients and required dose reduction in six patients and neutropenia reached grade 3/4 in 19 patients. 28.7% of patients required the use of granulocyte colony-stimulating factor.

			First cycle						All cycles					
	Grade 0-1		Grade 2		Grade 3-4		Grade 0-1		Grade 2		Grade 3-4			
Toxicity	N0.	%	N0.	%	N0.	%	N0.	%	N0.	%	N0.	%	N0.	%
Anemia	89	88.1	9	8.9	3	3.0	82	81.2	15	14.9	4	4.0		
Leukopenia	94	83.0	5	5.0	2	2.0	86	85.1	11	10.9	4	4.0		
Neutropenia	73	72.3	16	15.8	12	11.9	58	57.4	24	23.8	19	18.8		
Thrombocytopenia	101	100.0	0	0.0	0	0.0	101	100.0	0	0.0	0	0.0		
Nausea/vomiting	99	98.1	2	1.9	0	0.0	97	96.0	4	4.0	0	0.0		
Diarrhea	91	90.1	9	8.9	1	1.0	67	66.3	22	21.8	12	11.9		
Mucositis	99	98.1	2	1.9	0	0.0	93	92.1	7	9.7	1	4.2		

PD in 27 patients (26.8%). None of the UGT1A variants was associated with response a therapy.

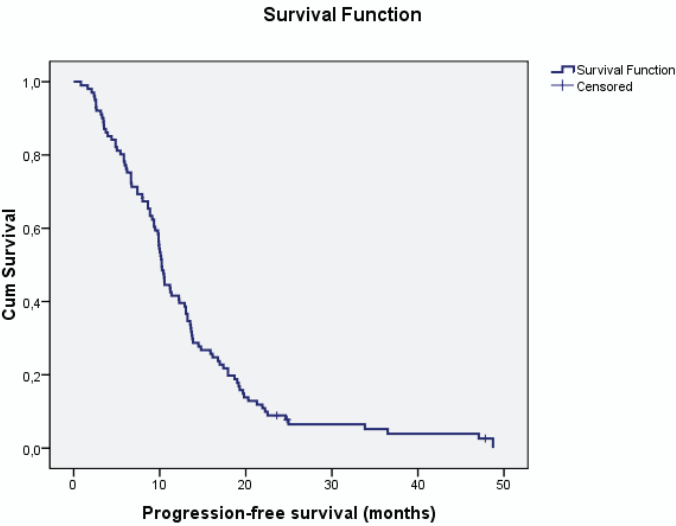
Polymorphisms	Response Rate % (CR+PR)	Poor-responsive % (SD+PD)	OR 95%CI	p
UGT1A1				
*28				
6/6	18(30.5)	41(69.5)	1.00 ref	
6/7	13(40.6)	19(59.4)	1.56 (0.63-3.82)	0.33
7/7	3(33.3)	6(66.7)	1.14 (0.26-5.06)	0.86
*93				
G/G	18(29.0)	44(71.0)	1.00 ref	
G/A	14(48.3)	15(51.7)	2.28 (0.92-5.68)	0.07
A/A	2(22.2)	7(77.8)	0.69 (0.13-3.69)	0.67
*60				
T/T	12(33.3)	24(66.7)	1.00 ref	
G/T	14(29.2)	34(70.8)	0.82 (0.32-2.09)	0.68
G/G	7(46.7)	8(53.3)	1.75 (0.51-5.98)	0.37
XRCC1 Arg399Gln				
G/G	14(36.8)	24(63.2)	1.0 ref	
G/A	11(23.4)	36(76.6)	0.52 (0.20-1.35)	0.18
A/A	9(56.2)	7(43.8)	2.20 (0.67-7.23)	0.19
ERCC1 Asn118Asn				
C/C	3(17.6)	14(72.4)	1.0 ref	
C/T	14(34.1)	27(65.9)	2.42 (0.59-9.85)	0.22
T/T	17(39.5)	26(60.5)	3.05 (0.76-12.23)	0.11
XPD-751				
A/A	16(33.3)	32(66.7)	1.0 ref	
A/A	17(39.5)	26(60.5)	1.31 (0.55-3.08)	0.54
A/C	1(10.0)	9(90.0)	0.22 (0.03-1.91)	0.17
C/C				
MTHFR C677T				
C/C	10(25.0)	30(75.0)	1.0 ref	
C/T	19(40.4)	28(59.6)	2.04 (0.81-5.12)	0.13
T/T	5(35.7)	9(64.3)	1.67 (0.45-6.16)	0.44
MTHFR A1298C				
A/A	14(35.0)	26(65.0)	1.0 ref	
A/C	16(39.0)	25(61.0)	1.19 (0.48-2.93)	0.71
C/C	4(20.0)	16(80.0)	0.46 (0.13-1.66)	0.24

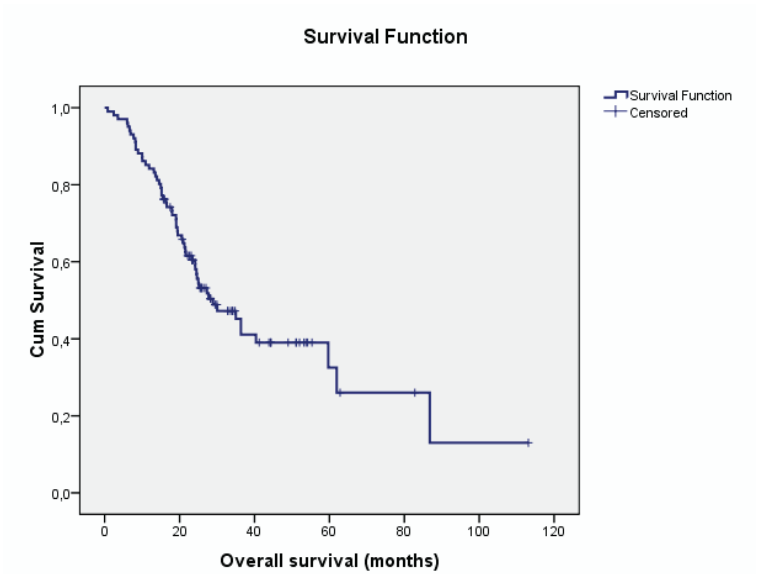
-
- ²⁵ Etienne MC, Formento JL, Chazal M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and response to fluorouracil-based treatment in advanced colorectal cancer patients. *Pharmacogenetics and Genomics* 2004;14.
- ²⁶ Balboa E, Duran G, Lamas MJ, Gomez-Caamaño A, Celeiro-Muñoz C, Lopez R, Carracedo A, Barros F. Pharmacogenetic analysis in neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer: high incidence of somatic mutations and their relation with response. *Pharmacogenomics*. 2010 Jun; 11(6):747-61.
- ²⁷ Cecchin E, Innocenti F, D'Andrea M, et al. Predictive role of the UGT1A1, UGT1A7 and UGT1A9 genetic variants and their haplotypes on the outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with fluorouracil, leucovorin and irinotecan. *J Clin Oncol* 2009; 27;2457-2465.
- ²⁸ Innocenti F, Kroetz DL, Schuetz E, et al. Comprehensive pharmacogenetic analysis of irinotecan neutropenia and pharmacokinetics. *J Clin Oncol* 2009;27:2604–14
- ²⁹ Nagar S, Blanchard RL. Pharmacogenetics of uridine diphosphoglucuronosyltransferase (UGT)1A family members and its role in patient response to irinotecan. *Drug Metab Rev* 2006;38:393–409.
- ³⁰ Toffoli G, Cecchin E, Gasparini G, et al. Genotype-driven phase I study of irinotecan administered in combination with fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:866–71
- ³¹ Martinez-Balibrea E, Abad A, Martinez-Cardús A, et al. UGT1A and TYMS genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy. *British journal of cancer* 2010;103:581-589.
- ³² Lamas MJ, Duran G, Gomez A, et al. X-ray cross complementing group 1 (XRCC1) and Thymidylate Synthase polymorphisms may predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer patients. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*.
- ³³ Martinez-Balibrea E, Adad A, Martinez- cardús, et al. UGT1A and TYMS genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy. *Br J Cancer* 2010;103:581-589.
- ³⁴ Carlini LE, Merolop NJ, Bever J, et al. UGT1A7 and UGT1A9 polymorphism predict response and toxicity in colorectal cancer patients treated with capecitabine/irinotecan. *Clin Canc Res* 2005;11:1226-1236.
- ³⁵ Artac M, Hakan B, Pehlivan S, et al. The value of XPD and XRCC1 genotype polymorphisms to predict clinical outcome in metastatic colorectal carcinoma patients with irinotecan-based regimens. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136:803-809.

EGFR (CA)n repeat *				
S/S	19(37.3)	32(62.7)	1.0	ref
S/L	9(27.3)	24(72.7)	0.63	(0.24-1.64) 0.34
L/L	6(35.3)	11(64.7)	0.92	(0.29-2.89) 0.88
TS 1494del6				
+6bp/+6bp	21(42.0)	29(58.0)	1.00	ref
+6bp/-6bp	9(22.0)	32(78.0)	0.39	(0.15-0.98) 0.05
-6bp/-6bp	4(40.0)	6(60.0)	0.92	(0.23-3.67) 0.91
TS 5'UTR VNTR				
2R/2R,2R/3C,3C/3C	24(39.3)	37(60.7)	0.54	(0.21-1.24) 0.14
2R/3G,3C/3G,3G/3G	10(25.0)	30(75.0)		

Survival

The median PFS time was 10 months (95% CI, 9.6-10.8), Figure 1. In the patients treated with first line the median PFS was 10.5 months and the second line was 9.9 months. The median OS time was 28.9 months (95% CI, 20.5-37.3). Figure 2





There was no statistical association between UGT1A haplotypes and free-progression survival (PFS). None of the other genotypes analyzed were significantly associated with PFS.

Discussion

In our series, UGT1A1 couldn't predict toxicity to FOLFIRI. Nor UGT1A1*28 nor UGT1A*93 and UGT1A*60. In two recent study^{27,xxvii} found that UGT1A1*60 and *93 are associated with the hematologic effect and with it has been suggested that the UGT1A1*93 variant might be a better predictor of the UGT1A1 status than the UGT1A1*28, this possibility remains to be proven.

Other predictors of irinotecan-induced toxicity could be nongenetic factors (neutrophil baseline levels or sex) or genetic factors (UGT1A1*93, ABCC11VS11 -48C>T, or SLCO1B1*1b.²⁸

Of the 60 or more UGT1A1 gene variants, two are responsible for 98–99% of the genotypes found in the US white population: UGT1A1*1 and *28. 44% of the US white population are homozygous for *1 (genotype *1/*1), 45% are heterozygous (genotype *1/*28); and 11% (about 1 in 10) are homozygous for *28 (genotype *28/*28). Other members of the family UGT also have some role (UGT1A 6, 7, 9, 10)²⁹.

Previous studies seem to show a clear relationship between the most common *UGT1A1**28 genotype and severe neutropenia (and some evidence of a relationship with severe diarrhea), but there is no direct or indirect (chain of evidence) evidence to support the clinical utility of modifying an initial and/or subsequent dose of irinotecan in patients with metastatic CRC as a way to change the rate of adverse drug events (e.g., severe neutropenia). Even if adverse drug-related events were reduced, this risk reduction may come at the expense of a reduction in tumor responsiveness in *28 homozygotes, leading to an overall net harm. The use of filgrastim may mask the need of reduction doses. Our study found no independent genetic factors that predicted toxicity. We found no significant association between the UGT1A1 genotype groups and grade 3 or 4 toxicity, consistent with the results of Toffoli^{xxvii} et al. and Cecchin^{xxx} et al.

Recently, Toffoli et al. evidenced that the recommended dose of 180 mg/m² for irinotecan in FOLFIRI is considerably lower than the dose that can be tolerated by the non-UGT1A1*28/*28 patients³⁰.

Our results do not support that patients received dose of 180 mg/m² biweekly of irinotecan were at a higher risk of developing severe hematologic toxicity and a recent study³¹ has been suggested that dose of 80 and 180 mg/m² developed severe toxicity. Marcuello^{xiv} et al. reported that the presence of one or two alleles of UGT1A1*28 was not associated with a significantly higher response rate or a survival advantage in patients with metastatic colorectal cancer who received irinotecan.

TS is a controversial pharmacogenetic target. High expression haplotypes or polymorphisms have been associated to poor response as it could be expected if this indicated resistance to 5-FU, and on the other side, our group has found that high expression was related to a better response to 5-FU chemoradiotherapy³². In this latter case, 5-FU was the only drug, and the potential role of TS as a prognostic factor is not weighed. In our current work, high expression genotypes was not related to a best PFS and objective response. A recent study³³ reported a strong correlation between TYMS 5'TRP genotypes and response treatment but no significant association with toxicity. Carlini et al³⁴ also evaluated the relationship between TYMS polymorphism and response to capecitabine and irinotecan in metastatic CRC patients but no significant association was noted.

In other study³⁵ show that XRCC1 codon 399 Arg/Arg genotype survival longer than patients with Gln/Arg and Gln/Gln who are treated with irinotecan. Also shows that polymorphism in the XPD gene may be associated with the overall survival in this patients. We don't know whether lack of associations in our study between these polymorphisms and response or survival.

NCCN clinical guidelines doesn't support the use of the test by the moment, however, experts point out that initial reduction must be considered with elevated bilirubin levels or Gilbert disease. A limitation of the present study is its retrospective design and relatively small study group. Prospective studies involving larger numbers of patients should be planned to confirm our hypothesis.

Our opinion is that the crucial point is not to test or not to test, but what to do next. The clinical utility of UGT1A1 testing remains uncertain, and shouldn't be incorporated to clinical practice until guidelines indicate how to use irinotecan if the patient is homozygous or heterozygous for UGT1A1*28 allele.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Fondo de Investigación Sanitaria; Instituto de Salud Carlos III, PI061712), from Fundación Ramón Areces and from Fundación Barrie de la Maza (Programa DIANA).

REFERENCES

- ¹ Tournigand C, André T, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004;22(2):229-237.
- ² Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350(23):2335-2342.
- ³ Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008;26(12):2013-2019.
- ⁴ Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al.; on behalf of the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007;25(12):1539-1544.
- ⁵ Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351(4):337-345.
- ⁶ Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;360(14):1408-1417.
- ⁷ Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, et al. An updated analysis of safety and efficacy of oxaliplatin (Ox)/bevacizumab (bev) +/- panitumumab (pmab) for first-line treatment (tx) of metastatic colorectal cancer (mCRC) from a randomized, controlled trial (PACCE). Proceedings of 2008 Gastrointestinal Cancers Symposium (Abstr 273). Orlando, FL 2008. Abstract available on www.asco.org.
- ⁸ Iyer L, King CD, Whittington PF, et al. Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J Clin Invest* 1998;101:847-54.
- ⁹ Iyer L, Das S, Janisch L, et al. UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J* 2002;2:43-7.
- ¹⁰ Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, et al. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* 2004;22:1382-8.
- ¹¹ Côté JF, Kirzin S, Kramar A, et al. UGT1A1 polymorphism can predict hematologic toxicity in patients treated with irinotecan. *Clin Cancer Res* 2007;13:3269-75.

-
- ¹² Rouits E, Boisdron-Celle M, Dumont A, Guérin O, Morel A, Gamelin E. Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecan-induced toxicity: a molecular and clinical study of 75 patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:5151–9
- ¹³ Massacesi C, Terrazzino S, Marcucci F, Rocchi MB, Lippe P, Bisonni R, et al. Uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A1 promoter polymorphism predicts the risk of gastrointestinal toxicity and fatigue induced by irinotecan-based chemotherapy. *Cancer* 2006; 106: 1007–16.
- ¹⁴ Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Del Rio E, Gomez-Pardo M, Baiget M. UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 678–82.
- ¹⁵ Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, Ibrahim JG, McLeod HL. UGT1A1*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1290–5
- ¹⁶ Zhe-Yi Hu, Qi Yu, Qi Pei, and Cheng Guo, et al. Dose-Dependent Association between UGT1A1*28 Genotype and Irinotecan-Induced Neutropenia: Low Doses Also Increase Risk. *Clin Cancer Res* 2010; 16(15): 3832-42.
- ¹⁷ Hu ZY, Yu Q, Zhao YS. Dose-dependent association between UGT1A1 *28 polymorphism and irinotecan-induced diarrhoea: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2010;46:1856–65
- ¹⁸ Etienne MC, Ilc K, Formento JL, Laurent-Puig P, Formento P, Chéradame S, Fischel JL, Milano G. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: relationships with 5-fluorouracil sensitivity. *Br J Cancer* 2004; 90: 526–34
- ¹⁹ Adamo V, Franchina T, Adamo B, Briguglio R, Restuccia E, Chiofalo G, Ferraro G, Caccamo D, Ientile R. Role of MTHFR polymorphism as predictive markers of acute toxicity during 5-fluorouracil based chemotherapy for colorectal cancer: preliminary data. *J Clin Oncol* 2008;26, 20 suppl abstract 15036
- ²⁰ Raida M, Schwabe W, Hausler P et al Prevalence of a Common Point Mutation in the Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Gene within the 5'-Splice Donor Site of Intron 14 in Patients with Severe 5-Fluorouracil (5-FU)- related Toxicity Compared with Controls. *Clinical Cancer Research* 2001; 7: 2832-9
- ²¹ Kawakami K, Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res* 2003;63:6004-7.
- ²² Marcuello E, Altes A, del RE, Cesar A, Menoyo A, Baiget M. Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2004;112:733-7.
- ²³ Lenz H-J, Zhang W, Zahedy S, et al. A 6 base-pair deletion in the 3' UTR of the thymidylate synthase (TS) gene predicts TS mRNA expression in colorectal tumors. A possible candidate gene for colorectal cancer risk. 43 ed. 2002. p. 660.
- ²⁴ Raida M, Schwabe W, Hausler P, et al. Prevalence of a Common Point Mutation in the Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Gene within the 5'-Splice Donor Site of Intron 14 in Patients with Severe 5-Fluorouracil (5-FU)- related Toxicity Compared with Controls. *Clinical Cancer Research* 2001;7:2832-9.

Artículo 3: X-ray cross complementing group 1 (XRCC1) and Thymidylate Synthase polymorphisms may predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer patients.

Maria J Lamas, Goretti Duran, Antonio Gomez, Emilia Balboa, Urbano Anido, Beatriz Bernardez, Pablo Rana-Diez, Rafael Lopez, Angel Carracedo, and Francisco Barros.

International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics
Article in press

ABSTRACT/ RESUMEN:

Objetivo: La quimiorradioterapia (5-FU) basada en 5-fluorouracilo antes de la escisión total del mesorrecto (TME) es actualmente el tratamiento estándar para pacientes de cáncer de recto en estadio II y III. Hemos utilizado biomarcadores farmacogenéticos predictivos para identificar respondedores a la quimiorradioterapia preoperatoria en nuestra serie.

Material y Método: 93 pacientes de cáncer rectal en estadio II / III fueron genotipados utilizando muestras de sangre periférica.

Los genes analizados fueron XRCC1, ERCC1, MTHFR, EGFR, DPYD y TYMS. Los pacientes fueron tratados con 225 mg/m²/día en infusión continua de 5-FU de forma concomitante con radioterapia (50,4 Gy) seguido de TME. Los resultados clínicos del tratamiento fueron medidos por el grado del tumor de regresión (TRG) en la pieza de resección quirúrgica. Hemos clasificado la eficacia clínica como Respuesta Mayor (TRG 1 y 2) y de Respuesta Pobre (TRG3, TRG TRG 4 y 5).

Resultados: La tasa de Respuesta Mayor histopatológicas fue de 47,3%. XRCC1 G / G tienen una mayor probabilidad de obtener esta respuesta que los portadores G/A (OR = 4.18; 95% IC 1.62 a 10.74, p = 0,003)

Los pacientes con polimorfismos asociados a la alta expresión de TS (2R/3G, 3C/3G y 3G/3G) mostraron una asociación con Respuesta Mayor patológica en comparación con los portadores de expresión baja (OR = 2,65, IC 95% 1.10-6.39, p = 0,02) No hubo diferencias significativas en la respuesta de acuerdo al EGFR, ERCC1, MTHFR_C677 y MTHFR_A1298.

Conclusiones: XRCC1 G / G y TS (2R/3G, 3C/3G y 3G/3G) son factores independientes de mayor respuesta. Los polimorfismos TS y XRCC1 en línea germinal pueden ser útiles como marcadores predictivos de respuesta en pacientes tratados con quimiorradioterapia neoadyuvante basada en 5-FU en tumores de recto.



CLINICAL INVESTIGATION

X-RAY CROSS-COMPLEMENTING GROUP 1 AND THYMIDYLATE SYNTHASE POLYMORPHISMS MIGHT PREDICT RESPONSE TO CHEMORADIOTHERAPY IN RECTAL CANCER PATIENTS

MARIA J. LAMAS, PHARM.D.,* GORETTI DURAN, PHARM.D.,* ANTONIO GOMEZ, M.D.,†
EMILIA BALBOA, B.C.S.,‡ URBANO ANIDO, M.D.,§ BEATRIZ BERNARDEZ, PHARM.D.,*
PABLO RANA-DIEZ, PH.D.,‡ RAFAEL LOPEZ, PH.D.,§ ANGEL CARRACEDO, PH.D.,¶
AND FRANCISCO BARROS, PH.D.¶

*Oncology Pharmacy Unit and Departments of †Oncology Radiotherapy and ‡Medical Oncology, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS), Choupana S/N, Santiago de Compostela, Spain; †Molecular Medicine Unit, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Choupana S/N, Santiago de Compostela, Spain; ‡Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica and Genomic Medicine Group-CIBERER, University of Santiago de Compostela, Calle San Francisco S/N, Santiago de Compostela, Spain

Purpose: 5-Fluorouracil-based chemoradiotherapy before total mesorectal excision is currently the standard treatment of Stage II and III rectal cancer patients. We used known predictive pharmacogenetic biomarkers to identify the responders to preoperative chemoradiotherapy in our series.

Methods and Materials: A total of 93 Stage II-III rectal cancer patients were genotyped using peripheral blood samples. The genes analyzed were X-ray cross-complementing group 1 (XRCC1), ERCC1, MTHFR, EGFR, DPYD, and TYMS. The patients were treated with 225 mg/m²/d continuous infusion of 5-fluorouracil concomitantly with radiotherapy (50.4 Gy) followed by total mesorectal excision. The outcomes were measured by tumor regression grade (TRG) as a major response (TRG 1 and TRG 2) or as a poor response (TRG3, TRG4, and TRG5). **Results:** The major histopathologic response rate was 47.3%. XRCC1 G/G carriers had a greater probability of response than G/A carriers (odds ratio, 4.18; 95% confidence interval, 1.62–10.74, $p = .003$). Patients with polymorphisms associated with high expression of thymidylate synthase (2R/3G, 3C/3G, and 3G/3G) showed a greater pathologic response rate compared with carriers of low expression (odds ratio, 2.65; 95% confidence interval, 1.10–6.39, $p = .02$). No significant differences were seen in the response according to EGFR, ERCC1, MTHFR_C677 and MTHFR_A1298 expression.

Conclusions: XRCC1 G/G and thymidylate synthase (2R/3G, 3C/3G, and 3G/3G) are independent factors of a major response. Germline thymidylate synthase and XRCC1 polymorphisms might be useful as predictive markers of rectal tumor response to neoadjuvant chemoradiotherapy with 5-fluorouracil. © 2011 Elsevier Inc.

Chemoradiotherapy, Polymorphisms, Rectal cancer, Thymidylate synthase, X-ray cross-complementing group 1, XRCC1.

INTRODUCTION

Rectal adenocarcinoma represents a severe illness owing to the high risk of locoregional recurrence and the development of distant metastasis. Chemotherapy and radiotherapy play important roles in the treatment of patients with rectal cancer.

The German Rectal Cancer Study Group trial showed that preoperative chemoradiotherapy was superior in local control and in reducing recurrences after the postoperative modality in patients with Stage II or III rectal cancer (1). A European Organization Research Treatment Cancer study

confirmed these data. The 5-year local recurrence rate was significantly reduced in the preoperative treatment group and toxicity was less important (6% vs. 13%) (2). This makes preoperative chemoradiotherapy the standard for Stage II-III rectal cancers.

More recently, the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project R3 trial concluded that neoadjuvant chemoradiotherapy significantly improved disease-free survival and showed a trend toward improved overall survival compared with adjuvant chemoradiotherapy (3). No patient achieving

Reprint requests to: Maria J. Lamas, Pharm.D., Oncology Pharmacy Unit, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Choupana S/N, Santiago de Compostela 15706 Spain. Tel: (00) 349-8195-1469; Fax: (00) 349-8195-1081; E-mail: mlamasd@yahoo.es

This work has been supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Fondo de Investigación Sanitaria; Instituto

de Salud Carlos III, PI061712), from Fundación Ramón Areces and from Fundación Barrie de la Maza (Programa DIANA).

Conflict of interest: none.

Received June 25, 2010, and in revised form Sept 14, 2010. Accepted for publication Sept 24, 2010.

a complete pathologic response developed recurrence. This is consistent with other published reports and could suggest that the response rate might provide an alternative endpoint for assessing the efficacy of preoperative chemoradiotherapy. However, those without a response will have toxicity helplessly. It would be useful to predict the response and to search for novel approaches for nonresponders.

The overexpression of thymidylate synthase (TS) has been associated with 5-fluorouracil (5-FU) resistance and poor prognosis in colorectal cancer. High intracellular TS levels might cause resistance to 5-FU. The polymorphic tandem repeat (VNTR) in *TS* 5'-untranslated region (5'UTR) (rs34743033) consists of either two or three 28-bp repeated sequences (2R or 3R alleles). 3R alleles have shown increased activity with upregulation of TS protein levels, and this has correlated with clinical outcomes and survival (4). A G/C polymorphism (rs2853542) within the 3R VNTR allele was found to determine two additional alleles (3G or 3C) at this locus. The 3G allele has been associated with greater gene activity. The combination of this single nucleotide polymorphism (SNP) and VNTRs allows for the definition of two groups of genotypes: *TS*, high expression (*2R/*3G, *3C/*3G, *3G/*3G) and *TS* low expression (*2R/*2R, *2R/*3C, *3C/*3C). The interval to progression and overall survival were significantly improved with the low-expression genotypes (5). Another *TS* polymorphism described (*TS* 1494del6) is a 6-bp insertion/deletion (6+/6-) in the 3'UTR (rs16430). Greater *TS* mRNA levels in the 6+/6+ genotype carriers than in 6-/6- genotype carriers might decrease the chemosensitivity to 5-FU (6).

More than 80% of 5-FU is inactivated by dihydropyrimidine dehydrogenase. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency appears to be a genetic disorder arising from multiple polymorphisms in the *DPYD* gene and resulting in decreased enzyme activity. Approximately 50% of all polymorphic alleles have a transition from G (guanine) to A (adenine) in exon 14 (IVS14 + 1G>A) (rs3918290). This allele, *DPYD**2A, has been associated with severe 5-FU-related toxicity (7).

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) catalyzes the conversion of 5,10-MTHF to 5-methylenetetrahydrofolate. The two most common polymorphisms of clinical significance are MTHFR A1298C (rs1801131) and C677T (rs1801133). Both polymorphisms could be used as predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy, because these mutations are related to decreased enzyme activity, accumulation of 5,10-MTHF, and increased inhibition of TS (8).

Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression has been associated with radiation resistance and the risk of local recurrence after preoperative radiotherapy in patients with rectal cancer. EGFR gene transcription activity declines with an increasing number of CA repeats in intron 1 (rs11568315). The length of the (CA)_n repeat variant < (CA)₁₇ or ≥(CA)₁₇ classifies alleles as S (short) or L (long), respectively, and these have shown a correlation with expression (9).

The individual capacity to repair damaged DNA might modify the response to radiotherapy. Previous reports have suggested that the variant allele *XRCC1* Gln399Arg (rs25487) results in deficient DNA repair and increased DNA and chromosome damage (10). *ERCC1* is involved in repairing DNA adducts, and its expression has been related to the response and survival in lung and bladder cancer patients. The SNP *ERCC1* Asn118Asn (rs11615) might predict the radiotherapy outcomes in head-and-neck cancer and has been proposed as a predictor of radiotherapy resistance.

We selected a comprehensive panel of SNPs and evaluated the associations of these polymorphisms with clinical outcomes to identify useful tools to predict the response to chemoradiotherapy in rectal cancer patients.

METHODS AND MATERIALS

Patients

The present study included 93 patients studied between March 2007 and December 2008. Our inclusion criteria were locally advanced operable rectal cancer, International Union Against Cancer Stage II or III, age >18 years, disease staging performed with at least computed tomography, colonoscopy, and endorectal ultrasonography and scheduled to undergo standardized chemoradiotherapy and additional surgery (total mesorectal excision). The main exclusion criteria were evidence of distant metastases and an inability to receive radiotherapy or 5-FU. The treatment consisted of radiotherapy to a total dose of 50.4 Gy (single dose, 1.8 Gy delivered in 28 fractions) with 5-FU as a continuous infusion of 225 mg/m²/d. The local ethical committee approved the present study. All patients provided written informed consent to establish the clinical significance of genetic polymorphism before participation.

Surgery and pathologic examination

The surgery was performed 6–8 weeks after chemoradiotherapy completion using the total mesorectal excision technique. The surgical procedures included abdominoperineal resection, anterior resection, and Hartman procedure.

Tumor regression grading (TRG) was performed on surgical specimens after preoperative CT/RT to a semiquantitative 5-point system established by Mandard *et al.* (11). TRG1 was defined as the absence of residual cancer; TRG2 as the presence of rare residual cancer cells; TRG3 as an increase in the number of residual cancer cells but with fibrosis predominating; TRG4 as residual cancer outgrowing fibrosis; and TRG5 as the absence of regressive changes. The tumor response in our series was classified as a major response (TRG1 and TRG2) or a poor response (TRG3, TRG4, and TRG5).

Staging was performed according to the TNM classification of the International Union Against Cancer 2002. Downstaging was present when the tumor had regressed by at least one T stage and one UICC stage. The tumor evaluation was determined by computed tomography scan, colonoscopy, and endorectal ultrasonography before and after treatment in all patients.

Genotype analysis

DNA was extracted from the peripheral blood samples collected from 93 rectal cancer patients on day 1 of treatment.

The *TS* promoter region polymorphism (5'VNTR) was analyzed by sequencing. The primers used were TGAATTTCACAGCTATT-TTGG (forward) and GCAGAACACTTCTTTATATAGCAACA

ARTICLE IN PRESS

XRCC1 and TS predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer ● M. J. LAMAS *et al.*

3

(reverse). The polymerase chain reaction (PCR) conditions were 95°C for 5 min, 35 cycles of 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, 72°C for 90 s, and, finally, 7 min at 72°C (12). After Exosap cleanup, sequencing reactions were run using the same primers and the Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA). The products were purified using the MultiScreen Kit (Millipore) and analyzed on an ABI 3730XL capillary sequencer.

The TS 1494del6 polymorphism and *EGFR* (CA)_n repeated polymorphism were analyzed using fluorescent fragment analysis. The PCR reaction conditions for TS1494del6 were 95°C for 5 min, 35 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min, and, finally, 7 min at 72°C, with the primers CTCCGTTCTGTGCCA-CACC (forward) and GGAGGATGTGTGGATCTGC (reverse) (13). The PCR reaction conditions for *EGFR* (CA)_n repeat polymorphism were 95°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 40 s, 72°C for 40 s, and 7 min at 72°C. The primers used were GGGCTCACAGCAACTTCTC (forward) and AAGCCA-GACTCGCTCATGTT (reverse). The genotypes were resolved on the ABI 3730XL genetic analyzer for allele length determination, and results were examined using GeneMapper software (14).

Polymorphisms at *MTHFR*, *XRCC1*, *ERCC1*, and *DPYD* were analyzed by the SnapShot method. Multiplex PCR was performed using the Qiagen Multiplex PCR Kit according to the manufacturer's instructions. The multiplex PCR primers and SNaPshot probes were *DPYD* IVS14+1G>A, forward, GAAACGCGTG-CATATTGGT, reverse, TTCACCAACTTATGCCAATTCT, and probe, ATAAACATTCACCAACTTATGCCAATTCTCTTGT-TTAGATGTAAATCACACTTA; *MTHFR* C677T, forward, TCACAAAGCGGAAGAATGT, reverse, GCCTCTCCTGACTGT-CATC, and probe, AGAATGTGTCAGCCTCAAAGAAAAG-CTGCGTGATGATGAAATCG; *MTHFR* A1298C, forward, CTTTGTGACCATTCGGTTT, reverse, TTTGGGGAGCTGAA-GGACTA, and probe, TCCGGTTTGGTTCTCCCGAGAGGTA-AAGAACAAAGACTTCAAAGACACTT; *XRCC1* Arg399Gln, forward, TCTGACTCCCCTCCAGATT, reverse, GCCCTCA-GATCACACCTA, and probe, GGC GTGTGAGGCCCTACCTC; *ERCC1* Asn118Asn, forward, TCCAGAACACTGGGACATGA, reverse, TCCCTATTGATGGCTTCTGC and probe AGGGG-CAATCCCGTACTGAAGTTCGTGCGCAA. The thermal cycling conditions consisted of 95°C for 5 min, 35 cycles of 95°C for 45 s, 60°C for 45 s, 72°C for 45 s, and 10 min at 72°C. Negative controls lacking DNA templates were set up with all PCR reactions. Each genotype assay was repeated at least two and up to three times. The PCR products were treated with 3 U of shrimp alkaline phosphatase and 2 U of exonuclease I to remove excess of deoxyribonucleotide triphosphates and primers, respectively. SNaPshot analysis was performed using an Applied Biosystems SNaPshot Multiplex Kit according to the manufacturer's protocol. Extension reactions consisted of 35 cycles of denaturation at 95°C for 10 s and annealing/extension at 58.5°C for 40 s. Labeled extension products were treated with shrimp alkaline phosphatase (1 U/sample). One microliter of the extension product was mixed with 9.8 µL of HiDi formamide and 0.2 µL of Genescan-120LIZ size standard. The products were denatured at 95°C for 5 min, then separated using an ABI 3730XL Genetic Analyzer with a 36-cm length capillary and POP-7 polymer. Analysis was performed using GeneMapper, version 3.7, software.

Statistical analysis

The chi-square test was used to compare the observed genotype distributions with those expected using the Hardy-Weinberg equilibrium. The chi-square test and Fischer's exact test were used for

the categorical variables to evaluate the association of the expression of genetic markers and the response to chemoradiotherapy and the difference between the gene polymorphisms and a major or poor response. In addition, binomial logistic regression methods were used to determine the strength of influence of the selected SNPs on the response prediction. The odds ratio (OR) and its 95% confidence interval (CI) were used to quantify the extent of any association. $p < .05$ was considered statistically significant. The analyses were done using the Statistical Package for Social Sciences, version 17.0 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Patients and treatment outcomes

A total of 93 patients with locally advanced rectal cancer were enrolled in the present study. Genotype-outcome analyses were conducted for all patients. The demographic details and clinical characteristics of the patients are listed in Table 1. The average patient age was 67 years (range, 39–84). At diagnosis, 26 patients had clinical Stage II and 67 had clinical Stage III. All patients completed the neoadjuvant planned treatment and underwent surgery. The average period from the end of neoadjuvant treatment and surgery was 9 weeks (range, 5–13). The total mesorectal excision technique was used. The patients were divided into two groups according to the neoadjuvant-surgery interval: <8 vs. ≥8 weeks. Of the 93 patients, 67 had an interval to surgery of ≥8 weeks. Within that group, 29 (43.28%) had a good treatment response. The remaining 26 patients had undergone surgery at an interval of <8 weeks, and 15 (57.7%) had a good response. No significant associations in those with a good response were observed between

Table 1. Baseline patient characteristics

Characteristic	Value
Age (y)	
Median	67
Range	39–86
Gender	
Male	68 (73.1)
Female	25 (26.9)
Tumor stage	
T1–T2	1 (1.1)
T3–T4	92 (98.9)
N0	26 (28)
N1–N2	67 (72)
Tumor localization	
Low rectum	44 (47.3)
Mid-rectum	32 (34.4)
High rectum	17 (18.3)
Histologic grade	
Well differentiated	35 (37.6)
Moderately differentiated	40 (43)
Poorly differentiated	4 (4.3)
Missed	14 (15.1)
Carcinoembryonic antigen (mg/100 mL)	
Mean ($n = 91$)	8.07
Range	0.6–71.4

Data presented as number of patients, with percentages in parentheses.

patients who had undergone surgery within 8 weeks and those who had undergone surgery after 8 weeks (OR, 0.560; $p = .214$).

The pathologic regression response in the resected rectum was classified according to the Mandard regression grade (Grades 1–5). Of the 93 surgical specimens, 29 (31.2%) showed a complete pathologic response (TRG1), characterized by a complete absence of residual tumor. TRG2 was observed in 15 patients (16.1%), TRG3 in 30 patients (30.3%), TRG4 in 14 patients (15.1%), and TRG5 in 5 patients (5.1%). Abdominoperineal resection was performed in 31 patients (33.3%), anterior resection in 56 patients (60.2%), and the Hartman procedure in 6 patients (6.5%). The pathologic findings in the surgical specimens are listed in Table 2.

The major response rate (TRG1+TRG2) to treatment was 47.3% (44 of 93 cases). Table 3 lists the relationship between the molecular markers and the clinical response to chemoradiotherapy.

Clinical tumor regression was evaluated by downsizing and downstaging. The results are listed in Table 4. The correlation of XRCC1 with downstaging is presented in Fig 1.

To assess the effect of treatment and molecular markers on the response, a binomial logistic regression model was used, with the probability of achieving a response as the variable dependent. This was adjusted by gender, age, and clinical stage. We found an association between *XRCC1* Arg399Gln and *TS* 5'UTR VNTR polymorphisms with the response ($p = .01$ and $p = .03$, respectively). *XRCC1* Arg/Arg was associated with a better response to treatment than the heterozygous Arg/Gln genotype (OR, 4.180; 95% CI, 1.627–10.741; $p = .003$). The difference in the response between Arg/Arg and Gln/Gln did not reach statistical significance

Table 2. Postoperative pathologic results

Variable	Value
Surgery	
Anterior resection	56 (60.2)
Abdominoperineal resection	31 (33.3)
Completeness of local resection	
R0	90 (96.8)
R1	3 (3.2)
Histotype	
Adenocarcinoma	82 (88.2)
Mucinous	11 (11.8)
Venous invasion	
V0	88 (94.6)
V1	5 (5.4)
Perineural infiltration	
No	81 (87.1)
Yes	12 (12.9)
Tumor regression grade	
1	29 (31.2)
2	15 (16.1)
3	30 (32.3)
4	14 (15.0)
5	5 (5.4)

Data presented as number of patients, with percentages in parentheses.

Table 3. Association of baseline characteristics and germline genetic variables with major histopathologic response rate (TRG1+TRG2) in patients undergoing chemoradiotherapy

Genes and polymorphisms	Major response (%)	Poor response (%)	<i>p</i>
Age (y)			.54
<65	18 (51.4)	17 (50.5)	
≥65	26 (44.8)	32 (55.2)	
Gender			.31
Female	14 (56.0)	11 (44.0)	
Male	30 (44.1)	38 (55.9)	
Clinical T stage			.34
T1–T2	0 (00.0)	1 (100.0)	
T3–T4	44 (47.8)	48 (52.2)	
Clinical N stage			.55
N0	11 (42.3)	15 (57.7)	
N1–N2	33 (49.3)	34 (50.7)	
Histologic grade			.54
Well differentiated	16 (45.7)	19 (54.3)	
Moderately differentiated	19 (47.5)	21 (52.5)	
Poorly differentiated	3 (75.0)	1 (25.0)	
Missing	6	8	
XRCC1 Arg399Gln			.01
A/A	4 (57.1)	3 (42.9)	
G/A	13 (30.9)	29 (69.1)	
G/G	27 (61.4)	17 (38.6)	
ERCC1 Asn118Asn			.67
C/C	7 (58.3)	5 (41.7)	
C/T	20 (47.6)	22 (52.4)	
T/T	17 (43.6)	22 (56.4)	
MTHFR C677T			.65
C/C	22 (47.8)	24 (52.2)	
C/T	15 (42.9)	20 (57.1)	
T/T	17 (77.3)	5 (22.7)	
MTHFR A1298C			.30
A/A	21 (52.5)	19 (47.5)	
A/C	20 (46.5)	23 (53.5)	
C/C	3 (30.0)	7 (70.0)	
EGFR (CA)n repeat*			.30
S/S	13 (37.1)	22 (62.9)	
S/L	16 (51.6)	15 (48.4)	
L/L	15 (55.6)	12 (44.4)	
TS 1494de16			.23
–6 bp/–6 bp	1 (16.7)	5 (83.3)	
+6 bp/–6 bp	21 (53.8)	18 (46.2)	
+6 bp/+6 bp	22 (45.8)	26 (54.2)	
TS 5'UTR VNTR			.03
2R/2R,2R/3C,3C/3C	22 (38.6)	35 (61.4)	
2R/3G,3C/3G,3G/3G	22 (61.1)	14 (38.9)	
XRCC1 Arg399Gln			.01
A/A	4 (57.1)	3 (42.9)	
G/A	13 (30.9)	29 (69.1)	
G/G	27 (61.4)	17 (38.6)	
ERCC1 Asn118Asn			.67
C/C	7 (58.3)	5 (41.7)	
C/T	20 (47.6)	22 (52.4)	
T/T	17 (43.6)	22 (56.4)	
MTHFR C677T			.65
C/C	22 (47.8)	24 (52.2)	
C/T	15 (42.9)	20 (57.1)	
T/T	17 (77.3)	5 (22.7)	
MTHFR A1298C			.30
A/A	21 (52.5)	19 (47.5)	
A/C	20 (46.5)	23 (53.5)	

(Continued)

ARTICLE IN PRESS

XRCC1 and TS predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer ● M. J. LAMAS *et al.*

5

Table 3. Association of baseline characteristics and germline genetic variables with major histopathologic response rate (TRG1 +TRG2) in patients undergoing chemoradiotherapy (Continued)

Genes and polymorphisms	Major response (%)	Poor response (%)	<i>p</i>
C/C	3 (30.0)	7 (70.0)	.30
EGFR (CA)n repeat*			
S/S	13 (37.1)	22 (62.9)	
S/L	16 (51.6)	15 (48.4)	
L/L	15 (55.6)	12 (44.4)	.23
TS 1494del6			
-6 bp/-6 bp	1 (16.7)	5 (83.3)	
+6 bp/-6 bp	21 (53.8)	18 (46.2)	
+6 bp/+6 bp	22 (45.8)	26 (54.2)	.03
TS 5'UTR VNTR			
2R/2R,2R/3C,3C/3C	22 (38.6)	35 (61.4)	
2R/3G,3C/3G,3G/3G	22 (61.1)	14 (38.9)	

Abbreviations: XRCC1 = X-ray cross-complementing group 1; ERCC1 = excision repair cross-complementing group 1; MTHFR = methylenetetrahydrofolate reductase; EGFR = epidermal growth factor receptor; TS = thymidylate synthase; UTR = untranslated region; VNTR = variable number tandem repeat.

* S: <17 CA repeats; L: 17 or >17 CA repeats.

(OR, 3.474; 95% CI, 0.368–18.902; $p = .150$). We also found that high expression of the TS 5'UTR (2R/3G, 3C/3G, and 3G/3G) allele was predictive of a major pathologic response (OR, 2.657; 95% CI, 1.105–6.391; $p = .029$) compared with those carrying low-expression alleles (Fig. 2). No associations were observed between *ERCC1* Asn118Asn, *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *EGFR* (CA)n repeat, and *TS* 1494del6 and the clinical response. The distribution of genotypes in our sample is in agreement with that predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium.

Toxicity was recorded in each patient, and tolerance was satisfactory, with Grade 3–4 toxicity (Common Toxicity Criteria, version 3.0) occurring in only 9 patients. The *DPYD**2A allele was found heterozygously in 1 patient

and was not significantly associated with clinical outcome and overall toxicity.

DISCUSSION

We found that *XRCC1* Arg/Arg and high expression *TS* 5'UTR VNTR genotypes were associated with major tumor regression and a major response to 5-FU–based chemoradiotherapy in rectal cancer patients. To our knowledge, this is the first work showing this association in a homogeneous cohort of almost 100 patients.

We used the histopathologic response of the surgical sample, as assessed by the pathologists, to perform our analysis. Previously, several investigators using different tumor regression grade classifications had shown their prognostic value. The group with a major response (TRG1 plus TRG2 by Mandard *et al.* (15) or TRG4 plus TRG3 by Losi *et al.* (16)) was positively related to disease-free survival in locally advanced rectal cancer after chemoradiotherapy. Other studies of different carcinomas treated preoperatively have confirmed this issue, with a major histopathologic response the most significant independent prognostic indicator.

Thymidylate synthase (*TS*) is a key gene in 5-FU pharmacogenetics. Its high expression has been related to resistance to 5-FU in early and advanced colorectal cancer and, in contrast, to a better response as TRG to chemoradiotherapy for rectal patients. The reasons for this discrepancy might have been the low number of patients, the heterogeneity of treatment in some studies, the comparison of results obtained by immunohistochemical staining with genotypes (17), or the use of polymorphisms determined according to the number of tandem repeats (VNTR) without considering the additional SNP G>C in the third repeat (18). Our work, in which high expression-related alleles predicted major responses, has some advantages over some of the cited studies. All patients underwent the same 5-FU radiotherapy scheme, and our analysis included the polymorphism VNTR in *TS* 5'UTR and the SNP C>G in 3R.

Table 4. Comparison between pretherapeutic and post-therapeutic tumor stage

Stage	Stage					Total
	T0	T1	T2	T3	T4	
T2	0	0	1	0	0	1 (1.1)
T3	24	5	21	28	1	79 (84.9)
T4	5	0	3	5	0	13 (14.0)
Total (%)	29 (31.2)	5 (5.4)	25 (26.9)	33 (35.4)	1 (1.1)	93 (100)
Pretreatment stage						
N0	22		N1–N2			
N1–N2	52		4			26 (27.96)
Total	74 (79.6)		19 (20.4)			67 (72.04)
						93 (100)

Data presented as numbers, with percentages in parentheses.

Tumor regression parameters became apparent by T stage downsizing (comparing cT and ypT) in 63 patients (67.7%); T stage decreased by one level in 26 patients (41.2%), two levels in 8 patients (12.6%), and three or four levels in 29 patients (46.0%). International Union Against Cancer (UICC) downstaging (comparing cUICC and ypUICC) achieved in 69 patients (74.2%). In 27 patients (29.0%), the tumor stage decreased by one, in 17 patients (18.3%) by two, and in 25 patients (26.9%) by three.

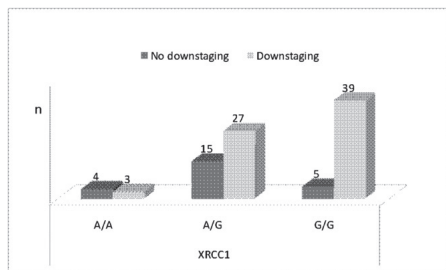


Fig. 1. Relationship of XRCC1 Arg399Gln genotypes with downstaging in patients treated with chemoradiotherapy ($n = 93$, $p = .004$, Fisher's exact test).

We found a positive relationship between the SNP XRCC Arg399Gln and the tumor response. The protein encoded by XRCC1 takes part in the efficient repair of DNA single-strand breaks formed by exposure to ionizing radiation and alkylating agents. Previous reports have suggested that the variant allele (Gln) results in deficient DNA repair and increased DNA and chromosome damage. This variant behaves as a prognostic and predictive marker (19, 20). This can be explained by the following hypothesis: suboptimal repair capacity in tissues favors carcinogenesis but might ensure tumor sensitivity to the drug or ionizing treatment. In contrast, repair proficiency protects tissues from cancer but could be a method of resistance to some treatments. XRCC1 polymorphisms have been widely studied as prognostic factors of risk cancers, predictors of response to platin (21), even related to the side effects of radiotherapy (22). In a recent work (23), another repair DNA gene was found to correlate with response to chemoradiotherapy; however, the treatment included platin and different combinations that could make difficult comparisons. Our results are consistent with the variant allele (Gln) role in the radiotherapy pathway; however, more research is needed to replicate our outcomes.

No serious toxicities occurred in the present series, and only 1 patient harbored an allele DPYD*2A. Therefore,

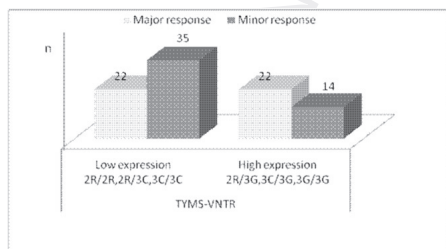


Fig. 2. Correlation between thymidylate synthase gene expression and pathologic response to chemoradiotherapy.

the results from the present study have not added relevant data to the utility of DPYD*2A, although it could have been for different reasons. In addition to the low sensitivity for this test, such as has been shown in previous reports, the dose of 5-FU used with radiotherapy was low because it was used as a radiosensitizer, not as a systemic antineoplastic agent. The deficiency in dihydropyrimidine dehydrogenase remained unexplained from a genetic viewpoint. Other approaches are being explored to find a useful predictive biomarker of toxicity by fluoropyrimidines (24).

The predictive value of MTHFR C677T and A1298C has been controversial. The first studies suggested that these polymorphisms could predict the efficacy or toxicity by fluoropyrimidines; however, additional studies failed to prove this relationship. Investigators have found that the MTHFR 677T-1298A haplotype has the potential to be a predictive marker of response to chemoradiotherapy in a group of patients similar to that of our series (25). It seems that MTHFR A1298C could be a prognostic factor in women. The overall survival was greater for the C/C female patients than for the A/C female patients in two different studies (26, 27). We did not find a significant association with response, not even in women. It might be that the underlying status of folate, modified by diet or constitutional issues, has an importance not yet well explored in this setting.

The EGFR pathway is involved in the resistance to radiotherapy, as well as ERCC1 (28). However, we have not found a correlation between the histopathologic response and ERCC1 Asn118Asn or EGFR (CA)n repeat variants. Several studies have found a relationship between the low expression of EGFR and the tumor response or downstaging after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer patients (29). However, not much data are available on the polymorphisms in EGFR or ERCC1 genes and the radiotherapy response (30). The study of genetics related to the response or resistance to radiotherapy has been less frequent than that of chemotherapy and has been limited to basic research. However, it would be necessary to explore the potential role of radiogenomics.

Two points of weakness might be expected in this type of study: the sample size analyzed and controversies between the somatic and germ line mutations. Although a review searching the concordance between somatic and germline posed a rate of 93–100%, the differences between genotypes in healthy tissues and tumors might be crucial when the genes affected are the therapy target (31). Currently, our group has been studying hypermutability in rectal tumors before and after multimodality treatment; however, we have not found that tumor genotypes are better predictors.

CONCLUSIONS

Our results have contributed to the future utility of TS and XRCC1 polymorphisms as predictors of neoadjuvant chemoradiotherapy outcomes in rectal cancer patients. Additional research is needed to find the genetic basis for the improvement of radiotherapy efficacy.

ARTICLE IN PRESS

XRCC1 and TS predict response to chemoradiotherapy in rectal cancer ● M. J. LAMAS *et al.*

7

REFERENCES

1. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, *et al.* Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1731–1740.
2. Bosset JF, Collette L, Calais G, *et al.* Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* 2006;355:1114–1123.
3. Roh MS, Colangelo LH, O'Connell MJ, *et al.* Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03. *J Clin Oncol* 2009;27:5124–5130.
4. Iacopetta B, Griew F, Joseph D, *et al.* A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Br J Cancer* 2001;85:827–830.
5. Marcuello E, Atlas A, del Rio E, *et al.* Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2004;112:733–737.
6. Lenz H, Zhang W, Zhaehedy S, *et al.* A 6 base-pair deletion in the 3'UTR of the thymidylate synthase (TS) gene predicts TS mRNA expression in colorectal tumors: A possible candidate gene for colorectal cancer risk [Abstract]. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2002;43:660.
7. Raida M, Schwabe W, Hausler P, *et al.* Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)-related toxicity compared with controls. *Clin Cancer Res* 2001;7:2832–2839.
8. Etienne MC, Formento JL, Chazal M, *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and response to fluorouracil-based treatment in advanced colorectal cancer patients. *Pharmacogen Genom* 2004;14:■–■.
9. Graziano F, Ruzzo A, Loupakis F, *et al.* Pharmacogenetic profiling for cetuximab plus irinotecan therapy in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1427–1434.
10. Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, *et al.* Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 2000;21:965–971.
11. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, *et al.* Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma: Clinicopathologic correlations. *Cancer* 1994;73:2680–2686.
12. Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, *et al.* A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res* 2003;63:2898–2904.
13. Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, *et al.* A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenet Genom* 2004;14.
14. Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biologic Chem* 1999;274:13176–13180.
15. Suarez J, Vera R, Balen E, *et al.* Pathologic response assessed by Mandard grade is a better prognostic factor than down staging for disease-free survival after preoperative radiochemotherapy for advanced rectal cancer. *Colorectal Dis* 2008;10:563–568.
16. Losi L, Luppi G, Gavioli M, *et al.* Prognostic value of Dworak grade of regression (GR) in patients with rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 2006;21:654–651.
17. Negri FV, Campanini N, Camisa R, *et al.* Biological predictive factors in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy or radiochemotherapy. *Br J Cancer* 2008;98:143–147.
18. Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, *et al.* Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:1779–1786.
19. Moreno V, Gemignani F, Landi S, *et al.* Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: Risk and prognosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:2101–2108.
20. Huang Y, Li L, Yu L. XRCC1 Arg399Gln, Arg194Trp and Arg280His polymorphisms in breast cancer risk: A meta-analysis. *Mutagenesis* 2009;24:331–339.
21. Wu X, Gu J, Wu TT, *et al.* Genetic variations in radiation and chemotherapy drug action pathways predict clinical outcomes in esophageal cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:3789–3798.
22. Chang-Claude J, Popanda O, Tan XL, *et al.* Association between polymorphisms in the DNA repair genes, XRCC1, APE1, and XPD and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005;11:4802–4809.
23. Cecchin E, Agostini M, Pucciarelli S, *et al.* Tumor response is predicted by patient genetic profile in rectal cancer patients treated with neo-adjuvant chemo-radiotherapy. *Pharmacogenomics J* 2010.
24. Ezzeldin HH, Lee AM, Mattison LK, *et al.* Methylation of the DPYD promoter: An alternative mechanism for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005;11:8699–8705.
25. Terrazzino S, Agostini M, Pucciarelli S, *et al.* A haplotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene predicts poor tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiation. *Pharmacogen Genom* 2006;16.
26. Zhang W, Press OA, Haiman CA, *et al.* Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and sex-specific survival in patients with metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:3726–3731.
27. Pare L, Salazar J, del Rio E, *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: Genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy in females. *J Clin Oncol* 2008;26:3468.
28. Ke L, Kian A, Luka M, *et al.* The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57:246–254.
29. Federica B, Carmelo B, Luisa L, *et al.* Prognostic and predictive value of baseline and posttreatment molecular marker expression in locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68:1455–1461.
30. Karen-Lise GS, Jens NN, Jan L, *et al.* Prediction of response to chemoradiation in rectal cancer by a gene polymorphism in the epidermal growth factor receptor promoter region. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66:500–504.
31. McWhinney SR, McLeod HL. Using germline genotype in cancer pharmacogenetic studies. *Pharmacogenomics* 2009;10:489–493.

Artículo 4: Pharmacogenetic analysis in neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer: high incidence of somatic mutations and their relation with response.

Emilia Balboa, Goretti Duran, Maria Jesus Lamas, Antonio Gomez-Caamaño, Catuxa Celeiro-Muñoz, Rafael Lopez, Angel Carracedo & Francisco Barros.

Pharmacogenomics (2010) **11**(6), 747–761.

Análisis farmacogenético de la quimioradioterapia neoadyuvante del cáncer rectal: alta incidencia de mutaciones somáticas y su relación con la respuesta.

ABSTRACT/ RESUMEN:

Objetivos: La identificación de marcadores predictivos de respuesta al tratamiento de quimio-radioterapia sigue siendo un enfoque prometedor para el tratamiento del paciente con el fin de obtener la mejor respuesta con los menores efectos secundarios. Inicialmente, se investigó si el análisis de varios marcadores previamente estudiados y otros que aún no están evaluados podrían predecir la respuesta al tratamiento neoadyuvante con 5-fluorouracilo o capecitabina en el cáncer de recto localmente avanzado.

Materiales y Métodos: Se analizó un panel de polimorfismos farmacogenéticos previamente asociados a respuesta a 5FU y radioterapia en muestras de línea germinal y tumoral de 65 pacientes con cáncer de recto en estadio II / III. Todos ellos habían firmado un consentimiento informado, el ADN germinal se obtuvo de leucocitos obtenidos de una muestra de sangre rutinaria antes de empezar el tratamiento, y el ADN tumoral de muestras de tumor parafinadas obtenidas durante la biopsia diagnóstica.

Resultados: Los resultados obtenidos parecen confirmar la asociación descrita previamente de la timidilato sintetasa y la predicción de respuesta a quimioterapia en cáncer de recto. Sin embargo, no se pudo confirmar la utilidad clínica propuesta para

XRCC1, ERCC1, ERCC2, MTHFR y los polimorfismos del EGFR en muestras de sangre/línea germinal. Posteriormente, con el objetivo de mejorar la predicción de la respuesta individual y la evaluación del papel de los polimorfismos estudiados en la respuesta al tratamiento, se determinó si los cambios en la respuesta del tumor con estos marcadores podría predecir la evolución clínica. Hemos encontrado un alto grado de las variaciones entre las muestras de línea germinal y tumor, que consistieron sobre todo en pérdidas de heterocigosidad y ganancia alélicas. Esto explica que XRCC1 aparezca significativamente asociado ($p = 0,006$) con disminución del estadio del tumor (odds ratio: 7.93, IC 95%: 1,03-60,83) en las muestras tumorales pero no en sangre. Asimismo, el incremento de alelos de baja expresión del TYMS contradice los resultados previos observados en muestras de línea germinal.

Conclusión: La detección de mutaciones somáticas en los tumores de cáncer de recto revela un estado de hipermutabilidad que debe ser tenido en cuenta en futuros análisis farmacogenéticos destinados a predecir eficacia. El análisis de polimorfismos en línea germinal es útil en el estudio de las toxicidades asociadas a genes de enzimas metabolizadoras, pero de dudosa eficacia en el análisis de genes diana en tumor.



For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Pharmacogenetic analysis in neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer: high incidence of somatic mutations and their relation with response

Aims: The identification of predictive markers of response to chemoradiotherapy treatment remains a promising approach for patient management in order to obtain the best response with minor side effects. Initially, we investigated whether the analysis of several markers previously studied and others not yet evaluated could predict response to 5-fluorouracil- and capecitabine-based neoadjuvant treatment in locally advanced rectal cancer. **Methods & materials:** We studied germline and tumoral samples of 65 stage II/III rectal patients. A panel of pharmacogenetic markers was genotyped in paired peripheral blood samples and rectal cancer tumors. **Results:** Our results seem to confirm the previously described association of thymidylate synthase and the prediction of chemoradiotherapy response in rectal cancer. However, it failed to confirm the clinical utility proposed for *XRCC1*, *ERCC1*, *ERCC2*, *MTHFR* and *EGFR* polymorphisms in blood/germline samples. Subsequently, with the aim of improving prediction of individual response and assessing the role of studied polymorphisms in response to treatment, we determined if changes in tumor response to these markers could predict clinical outcome. We found a high degree of changes between germline and tumor samples, mainly somatic mutations without microsatellite instability, and a minor frequency of loss-of-heterozygosity events. In tumoral samples, *XRCC1* appeared to be significantly associated ($p = 0.006$) with downstaging of the tumor (odds ratio: 7.93; 95% CI: 1.03–60.83), but the increasing of *TYMS* low-expression alleles contradict the previous results observed in germline samples. **Conclusion:** The detection of somatic mutations in rectal cancer tumors led us to re-evaluate the utility of the tests performed in blood samples for these polymorphisms in rectal cancer. Furthermore, studies aimed at assessing the influence of pharmacogenetic markers in treatment response performed in blood samples should take into account the particular pattern of hypermutability present in each tumor type. We hypothesize that different patterns of hypermutability present in each tumor type would be related to the different results in association studies related to response to the treatment.

KEYWORDS: chemoradiotherapy hypermutability pharmacogenetics
rectal cancer somatic mutation

Neoadjuvant treatment has been shown to cause a tumor downstaging effect in locally advanced rectal cancer [1,2]. Currently, 5-fluorouracil (5-FU)-based chemoradiotherapy before total mesorectal excision (TME) is the 'gold standard' treatment for stage II and III rectal cancer patients [3,4], but the overall rate of response is still approximately 46–74% [2,4]. Recently, several studies aimed at adding several different currently available chemotherapeutics in colon cancer treatment, including capecitabine, oxaliplatin [5], irinotecan [6], cetuximab [7] or bevacizumab [8], to this regimen have been performed. Thus, the identification of predictive markers of response to chemoradiotherapy treatment remains a promising approach for patient management in order to obtain the best response with minor side effects. 5-fluorouracil is an antimetabolite of the pyrimidine analog type that inhibits DNA and RNA synthesis. The main target for 5-FU is thymidylate synthase (TYMS). 5-FU acts by preventing the

methylation of the deoxyuridine monophosphate to deoxythymidine monophosphate by forming a stable complex, 5-FU–TYMS, causing a thymine deficiency [9]. The methylation reaction requires the availability of methyl donors, in this case, the 5,10-methylenetetrahydrofolate (CH_2THF), the concentration of which is regulated by several enzymes, such as methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) [10]. Since 80–85% of drug catabolic degradation occurs in the liver by dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) [11], deficiency of this enzyme leads to toxicity that can cause death [12]. Both the level of TYMS expression [13] and the degree of activity of MTHFR [14] have been associated with treatment effectiveness and toxicity, although the latter is mainly related to DPYD activity [15].

Radiotherapy uses ionizing radiation to induce cellular damage either directly or indirectly, through interactions with water-derived radicals causing both single strand breaks (SSB)

Emilia Balboa¹,
Goretti Duran², María
Jesus Lamas², Antonio
Gomez-Caamaño²,
Catuxa Celeiro-Muñoz²,
Rafael Lopez², Angel
Carracedo^{1,3} &
Francisco Barros¹

¹Grupo Medicina Xenómica–CIBERER, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela, Spain

²Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela (CHUS), Santiago de Compostela, Spain

³Grupo Medicina Xenómica–CIBERER, Universidad de Santiago de Compostela, Spain

Author for correspondence:
Fundación Pública Galega de Medicina
Xenómica, Hospital Clínico Universitario,
15706, Santiago de Compostela, Spain
Tel.: +34 981 951 490
Fax: +34 981 951 473
emilia.balboa@usc.es

future part of
medicine fsg

and double strand breaks (DSBs) in DNA. Cells that are exposed to radiation start a process that ultimately activates cell cycle checkpoints allowing DNA enzyme repair activity; when DNA damage cannot be repaired, cells undergo apoptosis [16,17]. In accordance with the damage caused, different repair systems are activated in cells [17]. SSBs are repaired by a rapid global SSB repair process, with X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1) as one of the most important proteins that mediate this process by acting as a molecular scaffold stabilizing and promoting different steps of the SSB repair process [18]: XRCC1 acts directly and indirectly by interacting with other molecules in the end processing, gap filling and ligation. DSBs are repaired by nonhomologous end-joining, homologous recombination [19] and single-strand annealing, and it is this kind of damage that generally leads to a lethal event [19]. Not only is excision repair cross-complementing 1 (ERCC1) an endonuclease of the nucleotide excision repair system that acts in the single-strand annealing repair, there is also evidence suggesting that ERCC1 acts in the homologous repair of DSBs [20–22]. Deficiency in this enzyme, and others implicated in the nucleotide excision repair system, has also been associated with hypersensitivity to radiation [23,24]. One of these enzymes, excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (ERCC2), is implicated in the repair of numerous types of damage, and although there are few data on the possible connection between this gene and radiotherapy response, it has been hypothesized to participate in the repair of ionizing radiation damage [25,26].

Although the volume of the literature on pharmacogenetic markers involved in the response to 5-FU is quite large [27,28], there are still few studies examining the relationship between pharmacogenetic markers and response to chemoradiotherapy [29], with most of them focused on p53, *Ki-67*, *p21*, and *bax/bcl-2* [30–33], cytochrome c oxidase II (COX-2) [31], EGF receptor (*EGFR*) [33] and TYMS [33,34]. However, the clinical utility of these biomarkers remains controversial [32], with *EGFR*, *p21* and TYMS as the most validated markers of response until now [32]. Ionizing radiation upregulates *EGFR*, thereby stimulating the MAPK pathway, which is one of the most important pathways induced by radiation exposure [35,36]. Furthermore, it seems that there is a positive relationship between the exposure to radiation and levels of ERCC1 and XRCC1 proteins, mediated by the MAPK pathway [36].

Although colorectal cancer is usually taken as one entity for most pharmacogenetic studies, the fact is that the differences in colon tumorigenesis mechanisms [37] suggests that analyzing tumor histological features and genetic differences in terms of anatomical position would be better. The proximal colon tumor is more prone to microsatellite instability than rectal and distal areas, whereas distal and rectal colon tumors have been associated with chromosomal instability and microsatellite stability [38–40]. Other genetic alterations, such as overexpression of *TP53* and *COX* genes, and the pattern of mutational frequencies or chromosomal alterations can explain the worse prognosis of patients with rectal cancer [41], but it is noteworthy that patients with different tumors but similar genetic and molecular background seem to have similar survival [42].

Tumor cells harbor numerous genetic, cytogenetic and molecular alterations, such as sequence changes, loss of heterozygosity (LOH), aneuploidy, chromosome translocations, gene amplification or copy number variation [43]. There is a chance of these differences playing a role by masking the association between the pharmacogenetic markers and the effectiveness of oncogenetic treatments when analysis is performed in blood samples. Our aim is to examine whether analysis of the differences in pharmacogenetic markers in tumor samples with respect to the peripheral blood can improve the prediction of the development of the patient undergoing chemoradiotherapy.

Materials & methods

■ Patients & clinical data

We studied germline and tumoral samples of 65 stage II/III rectal patients. They were staged by CT scan, colonoscopy and endorectal ultrasonography. The tumors were assessed by biopsy. Every treatment began in the 3 weeks following diagnosis and staging. The patients received 5-FU 225 mg/m²/day continuous infusion or capecitabine 825 mg/m² twice daily during weeks 1–5, along the fractionated radiotherapy schedule (1.89 Gy per day, 50.49 Gy over the whole treatment). The surgery was carried out 6–8 weeks after completion of chemoradiotherapy using the TME technique. The surgical procedure included abdominoperineal resection, anterior resection and Hartmann's operation.

Tumor regression was assessed using the tumor regression grading (TRG) system of Mandard *et al.* as follows [44]:

- TRG1: absence of residual cancer and extensive fibrosis;

- TRG2: rare residual cancer cells scattered through the fibrosis;
- TRG3: increased residual cancer cells but fibrosis still predominating;
- TRG4: residual cancer outgrowing fibrosis;
- TRG5: absence of regressive changes.

Tumors were classified as good responders (TRG1 and TRG2) or poor responders (TRG3, TRG4 and TRG5). All patients gave written informed consent.

Relevant clinical data were obtained from clinical records (gender, age, TRG and treatment). Response to treatment and overall survival were also analyzed. TRG was assessed by the pathologist in the surgical specimen.

■ Genotyping

Genomic DNA was extracted from paired peripheral blood samples and rectal cancer tumors. Blood was obtained before any treatment began, and the tumor used for genotyping was a sample from the initial biopsy. Germline DNA was obtained from leukocytes by peripheral blood samples using a magnetic particle-based purification kit (Chemagen, Baesweiler, Germany). Tumoral DNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded sections of the tumor samples after xylene treatment. DNA extraction was performed using the QIAamp® DNA Mini Kit Extraction Column (Qiagen®, CA, USA) in accordance with the protocol. The DNA obtained was rapidly frozen at -20°C.

■ Pharmacogenetic polymorphisms

We analyzed a panel of pharmacogenetics markers with previous evidence of relation or possible relation with the treatment currently used in rectal cancer. TABLE 1 summarizes genes and polymorphisms analyzed as well as the results of the most relevant pharmacogenetic evidence after a systematic review of the literature.

■ SNaPshot® assay

Polymorphisms at *XRCC1*, *ERCC1*, *ERCC2*, *GSTP1*, *MTHFR* and *DPYD* were analyzed by the SNaPshot® (SNaPshot Multiplex System, Applied Biosystems, CA, USA) method. Multiplex PCR primers and SNaPshot probes are listed in TABLE 2. Each probe was synthesised with a different length of poly(dT) tail to allow separation of SNaPshot products on the basis of size (TABLE 2). Multiplex PCR was performed using the Qiagen Multiplex PCR kit following the instructions provided by the manufacturer. Thermal cycle conditions

were: 95°C for 5 min, 35 cycles of 95°C for 45 s, 60°C for 45 s, 72°C for 45 s and finally 10 min at 72°C. The PCR products were treated with three units of shrimp alkaline phosphatase and two units of exonuclease I to remove excess dNTPs and primers, respectively. SNaPshot analysis was performed using an Applied Biosystems SNaPshot Multiplex kit according to the manufacturer's protocol. Extension reactions consisted of 35 cycles of denaturation at 95°C for 10 s and annealing and/or extension at 58.5°C for 40 s. Labeled extension products were treated with shrimp alkaline phosphatase (one unit per sample). A total of 1 µl of the extension product was mixed with 9.8 µl of HiDi™ Formamide (Applied Biosystems) and 0.2 µl of GeneScan™ 120 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems). Products were denatured at 95°C for 5 minutes then separated using an ABI 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) with a 36-cm-long capillary and Performance Optimized Polymer (POP-7™; Applied Biosystems). Analysis was performed using GeneMapper® 3.7 Software (Applied Biosystems).

■ Sequencing analysis

The *TYMS* promoter region polymorphism (5' variable number tandem repeat) was analyzed by sequencing. PCR primers are listed in TABLE 2. The PCR reaction conditions were 95°C for 5 min, 35 cycles of 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, 72°C for 90 s and finally 7 min at 72°C. After ExoSAP-IT® (GE Healthcare, NJ, USA) clean-up, sequencing reactions were run using the same primers and the BigDye® Terminator Kit (Applied Biosystems). Products were purified using MultiScreen™ Kit (Millipore, MA, USA) and analyzed on an ABI 3730XL capillary sequencer. The *TYMS* genotypes were grouped as high expression (2R/3G, 3C/3G and 3G/3G genotypes) or low expression (2R/2R, 2R/3C and 3C/3C genotypes) for statistical analysis.

■ Fluorescent fragment analysis

The *TYMS* 3'UTR polymorphism, *EGFR* promoter CA repeat polymorphism and microsatellite instability were analyzed by fluorescent fragment analysis. Primers are listed in TABLE 2 [45]. The PCR reaction conditions for 3'UTR-*TYMS* were 95°C for 5 min, 35 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min and finally 7 min at 72°C. The PCR reaction conditions for *EGFR* were 95°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 40 s, 72°C for 40 s and finally 7 min at 72°C. Microsatellite instability was assessed using the Microsatellite Instability

Table 1. Summary of the polymorphism analyzed in this study and the published relationship with rectal cancer treatments.

Gene	Drug	Polymorphism	Effect	Response/toxicity
<i>DPYD</i>	5-FU	<i>DPYD</i> *2 (IVS14+1 G->A) (rs3918290)	Decreased activity by deletion of exon 14 [72]	Severe toxicity: mucositis, neutropenia and neurological symptoms from treatment with 5-FU [15,73]
<i>TYMS</i>	5-FU Radiotherapy	5' 28-bp repeat (rs34743033) SNP G->C (rs2853542) TS1494del6 (rs16430)	More repetitions increase the efficiency of translation [74,73] High- and low-expression haplotypes [76,77] High: 2R/3G, 3C/3G, 3G/3G Low: 2R/2R, 2R/3C, 3C/3C Decreases the stability of mRNA [79]	TS protein levels inversely associated with tumor clinical response to treatment with 5-FU [75] Increased survival in low-expression groups undergoing treatment with 5-FU [77,78] Protective role in adjuvant treatment with 5-FU [80]
<i>MTHFR</i>	5-FU	SNP C677T (rs1801133) SNP A1298C (rs1801131)	The change Val222Ala leads to a thermolabile variant of MTHFR with reduced enzymatic activity [81] The change Glu429Ala results in decreased MTHFR activity [82]	Increased sensitivity to 5-FU [83,84]
<i>XRCC1</i>	Radiotherapy Oxaliplatin	Arg399Gln (rs25487)	Changes in binding capacity in the protein with the mutated allele to proteins that interact with it [85]	Ionizing radiation hypersensitivity [86] Resistance to oxaliplatin [87]
<i>ERCC1</i>	Radiotherapy Oxaliplatin	Asn118Asn (rs11615)	Predicts 50% decrease in the efficiency of translation of mRNA to protein [88]	Ionizing radiation hypersensitivity [28] Resistance to oxaliplatin [89]
<i>ERCC2</i> (XPD)	Radiotherapy Oxaliplatin	Lys751Gln (rs13181)	The wild-type allele exhibits suboptimal radiation-induced damage repair [88]	Possible predictor of clinical outcome [90] Resistance to oxaliplatin [91]
<i>EGFR</i>	Radiotherapy Cetuximab	CA-SSR1 (rs11568315)	Approximately 80% inhibition in alleles with 21 CA repeats [92]	EGF receptor expression is an indicator for poor response to preoperative radiotherapy [93] Increase in response associated with short alleles [94]

5-FU: 5-fluorouracil

Analysis System, Version 1.2 (Qiagen) following manufacturer protocol. Genotypes were resolved on the ABI 3730XL genetic analyzer for allele length determination, and the results were analyzed using the GeneMapper software. *EGFR* promoter CA repeat genotypes were grouped as more than 21 CA repeats or 21 CA repeats or fewer for statistical analysis.

■ Statistical analysis

The χ^2 test was used to assess the Hardy–Weinberg equilibrium. The associations between categorical parameters and polymorphism status were assessed by Fisher's exact test. All p-values are two tailed, and p-values of less than 0.05 were considered statistically significant. Multivariate binary logistic regression analysis was used to determine the independent association between genetic markers and TRG. Age, sex and stage, as clinically significant variables, were included in the regression calculations, and the adjusted odds ratios (ORs) were calculated. Associations were expressed as adjusted OR with 95% CI. Statistical analysis was performed on SPSS (v17, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

The analysis was performed in 65 enrolled rectal cancer patients, and their characteristics are shown in TABLE 3. The median age of the patients was 64 years (range: 37–85 years). The tumor was located in the upper third in 20% of the patients, in the middle third in 23% and in the lower third in 57%. All were submitted to undergo TME. Surgery was scheduled 6–8 weeks after completion of radiochemotherapy. The median time from the end of neoadjuvant treatment to surgery was 9 weeks (range: 5–13 weeks) using the TME technique. Patients were divided into two groups according to the neoadjuvant–surgery interval: fewer than 8 weeks and 8 weeks or more. A total of 46 patients in this study had an interval to surgery of at least 8 weeks. Of that group, 20 (43.48%) were good responders. A total of 19 patients underwent surgery at an interval of less than 8 weeks, of whom 11 (57.9%) were good responders. No significant associations were observed between good responders in patients operated before 8 weeks compared

with those operated after 8 weeks ($p = 0.297$; OR: 1.798). The surgery procedure included anterior resection in 39 patients, abdominoperineal resection in 23 patients and Hartman procedure in three patients. A histopathologically confirmed complete resection (R0 status) of proximal and distal resection margins was achieved in 62 cases. Tumor regression parameters became apparent by T-level downsizing (comparing pretreatment clinical tumor stage with pathological tumor stage after preoperative radiotherapy at surgery [ypT]) in 46 patients (70.8%). T-level was decreased by one level in 21 patients (32.3%), two levels in six patients (9.2%), three levels in 15 patients (23.1%) and four levels in four patients (6.2%). International Union Against Cancer (UICC) downstaging (comparing pretherapeutic clinical tumor stage according to UICC and post-therapeutic histopathologic tumor stage according to UICC) was performed in 49 patients (75.4%).

A total of 65 patients were evaluable for pathological response. Pathological staging was as follows:

- ypT0N0 19 patients (29.2%);
- ypT1N0 4 patients (6.2%);
- ypT2N0 18 patients (27.7%);
- ypT2N1 1 patient (1.5%) ;
- ypT3 in 23 patients (35.4%; N0:11, N1:10 and N2:2).

Complete pathologic response, TRG1, was observed in 19 (29.2%) patients, and TRG2 was observed in 12 other (18.5%) patients; thus, the rate of good response was 47.7% in this study. Of the remaining 52.3% of patients, 20 patients (30.8%) showed TRG3, ten patients (15.4%) TRG4 and four patients (6.1%) showed TRG5.

Table 2. Summary of the primers and probes used to analyze the pharmacogenetics markers.

Primer	Probe
Multiplex PCR primers	
DPYD_IVS14F	GAAAACGGCTGCATATTGGT
DPYD_IVS14R	TTCACCACTTATGCCAATTCT
MTHFR_C677T_F	TCACAAAGCGGAAGAATGT
MTHFR_C677T_R	GCCTCTCTGACTGTCATC
MTHFR_A1298C_F	CTTTGTGACCATTCGGTIT
MTHFR_A1298C_R	TTTGGGAGCTGAAGGACTA
XRCC1_F	TCTGACTCCCCTCCAGATT
XRCC1_R	GCCCCTCAGATCACACCTA
ERCC1_F	TCCAGAACTGGGACATGA
ERCC1_R	TCCCTATTGATGGCTTCTGC
ERCC2_F	GGCAAGACTCAGGAGTCACC
ERCC2_R	CCCTCTCCCTTCTCTCTGTT
GSTP1_565_F	CTGCAATCCTTGCCCTGT
GSTP1_565_R	GCTGGAGGTCTCTGCTCT
SNaPshot® probes	
DYPD-56BPR	ATAAACATTACCAACTTATGCCAATTCTCTGTTTATAGTGTTAAATCACACTTA
MTHFR-C677T-44BPR	AGAATGTGTCAGCCTCAAAGAAAAGTGCCTGATGATGAAATCG
MTHFR_A1298_50BPR	TCCGGTTTGGTCTCCCGAGAGGTAAAGAACAAGACTTCAAGACACTT
XRCC1_20BPR	GGCGTGTGAGGCCTTACCTC
ERCC1_32BPF	AGGGGCAATCCCGTACTGAAGTTCGTGCGCAA
ERCC2_26BPF	AGCAGCTAGAATCAGAGGAGACGCTG
GSTP1-35- BPR	CTTGCCCGCTCATAGTTGGTGATAGTAGGGAGA
5'UTR primers	
TYMS_28BP_F	CTCCGTCTGTGCCACACC
TYMS_28BP_R	GGAGGATGTGTGGATCTGC
3'UTR primers	
TYMS_6BP_F	TGAATTCACAAGCTATTTTGG
TYMS_6BP_R	GCAGAACACTTCTTATTATAGCAACA

Table 3. Characteristics of the 65 patients.

Characteristic	n (%)
Gender:	
– Female	15 (23.1)
– Male	50 (76.9)
Age (years):	
– Median	64
– Range	37–85
Clinical stage:	
– II	20 (30.8)
– III	45 (69.2)
Tumor localization:	
– Rectal	65 (100)
Tumor regression grading:	
– 1	19 (29.2)
– 2	12 (18.5)
– 3	20 (30.8)
– 4	10 (15.4)
– 5	4 (6.1)
Neoadjuvant therapy:	
– 5-fluorouracil, uracil-FT-207 plus radiotherapy	46 (70.8)
– Capecitabine plus radiotherapy	19 (29.2)

The germline DNA of those patients was genotyped for *XRCC1*, *ERCC1*, *ERCC2*, *MTHFR*, *EGFR* and *TYMS* polymorphisms and correlated to tumor downstaging after preoperative chemoradiation. The genotype frequencies in each gene are listed in TABLE 4. The distribution of the genotypes is in agreement with that predicted by the Hardy–Weinberg equilibrium. The overall frequencies of the studied polymorphisms were found to be similar to those described in previous reports.

At univariate analysis (TABLE 4), we found a significantly better response rate for genotypes with at least one high-expression *TS* 5'UTR (*TSER**3G) allele compared with individuals carrying two low-expression (*TSER**2R and *TSER**3C) alleles ($p = 0.018$). There was no statistical association between clinical baseline characteristics and response to treatment. When adjusted for sex, age and stage, the OR for genotypes with high-expression *TS* 5'UTR alleles was 2.19 (95% CI: 1.09–4.40; $p = 0.022$) relative to the odds of responding for low-expression *TS* 5'UTR genotypes. No significant associations were observed between TRG status and *XRCC1*, *ERCC2*, *ERCC1*, *MTHFR* C677, *MTHFR* A1298C and *EGFR* polymorphisms. However, the statistical power of the study was limited by the small number of cases studied.

Tumor samples from the 65 patients were analyzed with the aim of improving prediction of individual response and assessing the role of studied polymorphisms in response to treatment.

TABLE 5 shows the genotype frequencies for the analyzed polymorphisms. *ERCC2*, *ERCC1*, *MTHFR* C677T and *MTHFR* A1298C genotyping were performed in all samples, whereas *XRCC1*, *EGFR* and *TYMS* genotyping could only be completed in 97% (63 samples), 85% (55 samples) 95% (62 samples) respectively.

The associations observed in blood did not remain in the univariate analysis (TABLE 5) of the genotypes obtained from the tumor samples, and the only marker that reached statistical significance was *XRCC1*, with genotype A/A being associated with a better response to treatment compared with individuals carrying a G allele ($p = 0.006$). We obtained the same results by applying a multinomial regression model; the OR, adjusted for sex, age and stage, for the A/A *XRCC1* genotype was 7.93 (95% CI: 1.03–60.83; $p = 0.036$). Finally, no significant associations were observed between TRG status and the remaining polymorphisms.

Many differences between the genotype determined in blood and tumor samples were found (TABLES 6–8). Loss of heterozygosity but no microsatellite instability was observed in the present study. Only 14 paired samples (21.5%) had no genotype discrepancies in the eight polymorphisms between tumor and germline DNA, and four samples (6.5%) had one. Most tumors (72.5%) had two or more changes in genotypes. It is noteworthy that the rate of changes varied between polymorphisms (mean 22.3% of the samples; standard deviation: 16.6), with *TS* 5'UTR variable number tandem repeat being the most variable marker (62.9% of the samples) and *ERCC1* the least variable one (9.2% of the samples). The characteristics of observed interindividual genotype changes are reported in TABLES 6–8.

We also found differences in the peak heights in the genotyping of the *TYMS* 3'UTR and differences in the peaks of the sequences from samples heterozygous for *TYMS* 5'UTR, as well as allelic heterogeneity in repeated samples for testing; in these samples, we assume the genotype was most similar to the germline or the more repeated one (data not shown).

Discussion

The initial aim of this study was to investigate the role of several polymorphisms in the TRG status after chemoradiation in rectal cancer patients with grades II and III. A significant association between a good responder rate and *TYMS* was found in the germline DNA sample. We evaluated the possible relationship

between the markers *XRCC1*, *ERCC1*, *ERCC2* and response to radiotherapy, as well as other markers that are related with response to 5-FU chemotherapy response. No significant association was observed with those markers, although when the tumor samples were analyzed, a significant association with *XRCC1* was observed. To our knowledge, this is the first time that the

relationship of *XRCC1* and *ERCC1* polymorphisms with response to chemoradiotherapy in rectal cancer has been evaluated. *ERCC2* has only been evaluated once before [46]. In addition, most tumors (72%) had two or more changes in genotypes. The rate of changes varied between different polymorphisms (mean rate of change: 22.3%; *TYMS* was the most

Table 4. Univariate and multivariate analysis for association of baseline characteristics and germline genetic variables with tumor regression grade (Fisher's exact test and multinomial logistic regression).

Characteristic	Good responders [†] , n (%)	Poor responders [†] , n (%)	p-value
Age (years):			
– <65.5	17 (50.0)	17 (50.0)	0.44
– >65.5	14 (45.2)	17 (54.8)	
Gender:			
– Female	8 (53.3)	7 (46.7)	0.42
– Male	23 (46.0)	27 (54.0)	
Stage:			
– II	7 (35.0)	13 (65.0)	0.14
– III	24 (53.3)	21 (46.7)	
<i>XRCC1</i> :			
– A/A	3 (75.0)	1 (25.0)	0.29
– G/A	12 (38.7)	19 (61.3)	
– G/G	16 (53.3)	14 (46.7)	
<i>ERCC1</i> :			
– C/C	3 (37.5)	5 (62.5)	0.74
– C/T	16 (53.3)	14 (46.7)	
– T/T	12 (44.4)	15 (55.6)	
<i>ERCC2</i> :			
– A/A	11 (44.0)	14 (56)	0.63
– A/C	17 (47.2)	19 (52.8)	
– C/C	3 (75.0)	1 (25.0)	
<i>MTHFR</i> _C677:			
– C/C	14 (46.7)	16 (53.3)	0.78
– C/T	14 (51.9)	13 (48.1)	
– T/T	3 (37.5)	5 (62.5)	
<i>MTHFR</i> _A1298:			
– A/A	14 (48.3)	15 (51.7)	0.70
– A/C	14 (51.9)	13 (48.1)	
– C/C	3 (33.3)	6 (66.7)	
<i>EGFR</i> :			
– >21 CA repeats	4 (44.4)	5 (55.6)	0.56
– 21 or <21 CA repeats	27 (48.2)	29 (51.8)	
TS-3'UTR:			
– 6 bp/-6 bp	1 (20.0)	4 (80.0)	0.51
– +6 bp/-6 bp	14 (51.9)	13 (48.1)	
– +6 bp/+6 bp	16 (48.5)	17 (51.5)	
TS-5'UTR:			
– 2R/3G, 3C/3G, 3G/3G [‡]	16 (66.7)	8 (33.3)	0.018
– 2R/2R, 2R/3C, 3C/3C	15 (36.6)	26 (63.4)	
TS haplotypes:			
– 1 or 2 -6 bp 3G haplotype	12 (60.0)	8 (40.0)	0.15
– None -6 bp 3G haplotype	19 (42.2)	26 (57.8)	

[†]TRG1 and TRG2.

[‡]TRG3, TRG4 and TRG5.

[§]Odds ratio: 2.19; 95% CI: 1.09–4.40; p = 0.022 (binary logistic regression model after adjustment for gender, age and stage).

TRG: Tumor regression grading.

Table 5. Univariate and multivariate analysis for association of tumor genetic variables with tumor regression grade (Fisher's exact test and multinomial logistic regression).			
Characteristic	Good responders [†] , n (%)	Poor responders [†] , n (%)	p-value
<i>XRCC1</i>			
– A/A [‡]	6 (100.0)	0 (00.0)	0.006
– G/A	14 (35.0)	26 (65.0)	
– G/G	9 (52.9)	8 (47.1)	
– Missing	2	–	
<i>ERCC1</i>			
– C/C	3 (75.0)	1 (25.0)	0.54
– C/T	14 (43.8)	18 (56.3)	
– T/T	14 (48.3)	15 (51.7)	
<i>ERCC2</i>			
– A/A	11 (42.3)	15 (57.7)	0.53
– A/C	19 (50.0)	19 (50.0)	
– C/C	1 (100.0)	0 (00.0)	
<i>MTHFR_C677</i>			
– C/C	13 (50.0)	13 (50.0)	0.85
– C/T	12 (42.9)	16 (57.1)	
– T/T	6 (54.5)	5 (45.5)	
<i>MTHFR_A1298</i>			
– A/A	11 (45.8)	13 (54.2)	1.00
– A/C	17 (48.6)	18 (51.4)	
– C/C	3 (50.0)	3 (50.0)	
<i>EGFR</i>			
– >21 CA repeats	2 (66.7)	1 (33.3)	0.46
– 21 or <21 CA repeats	24 (46.2)	28 (53.8)	
– Missing	5	5	
<i>TS-3'UTR</i>			
– -6 bp/-6 bp	2 (22.2)	7 (77.8)	0.15
– +6 bp/-6 bp	9 (41.0)	13 (59.0)	
– +6 bp/+6 bp	19 (57.6)	14 (42.4)	
– Missing	1	–	
<i>TS-5'UTR</i>			
– 2R/3G, 3C/3G, 3G/3G	7 (22.2)	5 (77.8)	0.24
– 2R/2R, 2R/3C, 3C/3C	21 (42.0)	29 (58.0)	
– Missing	3	–	
<i>TS haplotypes</i>			
– 1 or 2 -6 bp 3G haplotype	4 (50.0)	4 (50.0)	0.51
– None -6 bp 3G haplotype	23 (43.4)	30 (56.6)	
– Missing	4	–	
[†] TRG1 and TRG2.			
[‡] TRG3, TRG4 and TRG5.			
[§] Odds ratio: 7.93; 95% CI: 1.03–60.83; p = 0.036 (binary logistic regression model after adjustment for gender, age and stage).			
TRG: Tumor regression grading.			

variable marker [62.9% of the samples]) and the least variable ones (*ERCC1* [9.2%] and *DPYD* [0%]).

■ Response to 5-FU & capecitabine

Besides the fact that studies in pharmacogenetics promise benefits to patient treatments, concerns exist regarding the lack of replication of discoveries [47]. The identification of pharmacogenetic markers involved in the response to 5-FU have been thoroughly studied in colorectal cancer, indicating an important role of TYMS in this area.

However, it is noteworthy that the numerous studies carried out on this relation show contradictory results [48], as well as the existence of a lack of reply in the various studies carried out to establish an association between *MTHFR* genotype and effectiveness of 5-FU [49]. Thus, although most studies report a *TYMS* expression decrease with a better response [50], there are studies that contradict this association [51], regarding both the genotype and level of expression, and that link genotypes of high expression of *TYMS* with a better response [51], as our data suggest, and even a lack of association [52].

It is also notable that the reported association of response with the alleles described as having low expression is observed regardless of whether the G/C polymorphism (rs2853542) has been considered, in addition to the number of repeats, in the classification of allelic expression [13,53].

For some polymorphisms, this relationship has been evaluated in both blood samples and tumor tissues [54], but the consistency in results between the techniques used, as well as the correlation between samples, has rarely been verified. The assumption underlying many pharmacogenetic genotyping studies, which are usually performed on blood samples, is that germline and somatic DNA variation is equivalent [55]. However, in tumor cells, numerous cytogenetic and molecular alterations are produced, such as LOH, aneuploidy, gene amplification or changes in the copy number of variable tandem repeats, that need to be taken into account [56]. All these alterations were found in relation to *TYMS* [57–62]. Many of these events occur in the early stages of cancer development and should be taken into account when considering the equivalence of germline and somatic DNA as shown in a study by Lips *et al.* [63], in which many alterations were found by comparing patterns of chromosomal instability in adenoma and carcinoma fractions with pure adenomas [63].

Despite LOH being the most reported tumoral event in *TYMS* (48–77% of cases) [57,58], changes in the tumor affecting this gene copy number appears to be an important event that explains the *TYMS* gene expression increase in tumors. Jensen *et al.* estimated 1.7 copies per nucleus of *TYMS* [59], and Ooyama *et al.* found an increase in copy number using Affymetrix GeneChip® microarrays (Affymetrix, CA, USA) [60]. On the other hand, Brody *et al.* detected copy number changes due to polysomy in a panel of pancreatic cancers with matched normal tissue and in gastrointestinal cancer cell lines [61]. All these studies found association with resistance to 5-FU. Watson *et al.*, studying colorectal liver metastases, found a

Table 6. Changes germline versus tumor: loss of heterozygosity and gain of alleles in *EGFR* and *TYMS* genes.

Change	<i>EGFR</i>	<i>TS 5'UTR</i>	<i>TS 3'UTR</i>
Loss of heterozygosity [†]	4 (26.7%)	14 (35.0%)	11 (40.0%)
Gain of allele [‡]	8 (14.5%)	25 (40.3%)	7 (18.4%)
Total [§]	12 (21.8%)	32 (62.9%)	18 (28.1%)

[†]Number (%) of losses detected. Percentage was calculated based on the number of heterozygotes.
[‡]Number (%) of gains detected. Percentage was calculated based on the number of homozygotes.
[§]Number (%) of changes detected. Percentage was calculated based on the total number of samples.

copy number increase in individuals treated with 5-FU as well in those who had not been treated with the drug, and indicated that LOH was a rare event [62].

While our data suggest an association between *TS 5'UTR (TSE*3G)* allele and good response ($p = 0.018$) in germline DNA, this association is lost in the analysis of the tumor, resulting in an increase in low-expression alleles in the tumor regarding blood, reaching a proportion of 80.6% in the tumor samples, which coincides with the percentage determined by Stoehlmacher *et al.* in stage II/III rectal cancer.

Our data on rectal cancer suggest that, as stated by Brody *et al.* [61], *TS* copy number in tumor does not usually agree with the germ line genotype, but we cannot confirm their suggestion regarding that *TS* copy number in a patient's tumor may be a dominating variable affecting 5-FU responsiveness.

Similar to Lips *et al.* [63] and Losi *et al.* [64], who reported an allelic heterogeneity of 90%, and Baisse *et al.* [65], who indicated a lower percentage (67%), we found a high degree of allelic heterogeneity (data not shown).

■ Response to radiotherapy

The DNA damage-repairing genes analyzed have been associated with hypersensitivity to radiation [23,24]. These genes and *EGFR* have been studied in terms of both treatment efficacy and toxicity and survival [66] in different tumor types; only a few publications are related to rectal cancer [67,68], but the results are not conclusive.

Table 7. Germline changes versus tumor changes: loss of heterozygosity and gain of alleles in *XRCC1*, *ERCC1*, *ERCC2*, *GSTP1*, *MTHFR* and *DPYD* genes.

Change	<i>XRCC1</i> (%)	<i>ERCC1</i> (%)	<i>ERCC2</i> (%)	<i>GSTP1</i> (%)	<i>MTHFR C677</i> (%)	<i>MTHFR A1298</i> (%)	<i>DPYD</i> (%)	Total (%) [†]
Loss of heterozygosity [†]	3 (9.7%)	2 (6.7%)	3 (8.3%)	4 (16.7%)	6 (22.2%)	0	0	18 (32%)
Gain of allele [‡]	12 (35.3%)	4 (11.4%)	5 (17.2%)	2 (4.9%)	7 (18.4%)	8 (21.4%)	0	38 (68%)
Total [§]	15 (23.8%)	6 (9.2%)	8 (12.3%)	6 (10.5%)	13 (20.0%)	8 (12.3%)	0	56 (100%)

[†]Total number (%) of each type of change. Percentage was calculated based on the total number of changes.
[‡]Number (%) of losses detected. Percentage was calculated based on the number of heterozygotes.
[§]Number (%) of gains detected. Percentage was calculated based on the number of homozygotes.
[¶]Number (%) of changes detected. Percentage was calculated based on the total number of samples.

Table 8. Germline changes versus tumor changes: single base substitutions.								
Substitution	<i>XRCC1</i> (%)	<i>ERCC1</i> (%)	<i>ERCC2</i> (%)	<i>GSTP1</i> (%)	<i>MTHFR C677</i> (%)	<i>MTHFR A1298</i> (%)	<i>DPYD</i> (%)	Total (%)
Substitutions at C:G base pairs								
C:G>T:A [†]	14 (15.4%)	6 (13.0%)		3 (8.8%)	10 (11.5%)		0	33 (58.9%)
C:G>A:T [†]			6 (13.6%)			3 (6.7%)		9 (16.1%)
Substitutions at T:A base pairs								
T:A>C:G [†]	1 (2.6%)	0 (0%)		3 (3.1%)	3 (6.9%)			7 (12.5%)
T:A>G:C [†]			2 (2.3%)			5 (5.9%)		7 (12.5%)
Total [‡]	15 (26.8%)	6 (10.7%)	8 (14.3%)	6 (10.7%)	13 (23.2%)	8 (14.3%)		56 (100%)

[†]Number (%) of detected changes. Percentage was calculated based on the number of alleles that could mutate.
[‡]Number (%) of detected changes. Percentage was calculated based on the total number of changes detected.

We only found a significant association ($p = 0.006$) between genotype A/A of *XRCC1* in the response to treatment when the tumor samples of the patients were analyzed. This association is due to the increase of the A alleles in the tumor compared with lymphocytes, resulting in an increase of the heterozygotes too.

■ Somatic mutations & hypermutability in rectal cancer

As expected, many alterations were found in tumors compared with the germline genotype. In fact, 72% of samples have a high degree of alterations (≥ 2 differences from the blood).

Estimated rates of LOH and gain of each allele are shown in TABLES 6 & 7, the frequency is calculated on the number of heterozygous and homozygous, respectively, found in our sample. As shown, LOH rates varied widely from 6.7 to 40%. The observed values can be consistent for *XRCC1*, *ERCC2* and *ERCC1* polymorphisms, quite closely linked to 19q13.31–32, but are contradictory in the two linked *MTHFR* SNPs (22.2% vs. 0%) located in 1p36.22.

Loss of heterozygosity is a normal event in the carcinogenesis process, but this seems to have a clear pattern depending on the type of cancer. Thus, LOH on chromosome 1p and 19q has not been identified in early stages of colorectal cancer, but gain of chromosome 19q has been detected as a late event in the evolution of the tumor [63,69]. Changes detected in the markers located in 19q are more likely to occur by point mutations than deletions. Taken together, these results suggest that we cannot ensure that the rate of LOH observed in the sample is real and not due to further mutations.

Furthermore, the gain of alleles represents a significant percentage of the observed changes (68%), indicating that it is a major event in this type of tumor. Our data indicate that there are patients with a high degree of variation caused

by allelic gain between germline and tumor. However, an association between mutability grade and response to treatment was not observed.

We studied the spectrum of mutations found in each polymorphism. The frequency spectrum of mutations was calculated in respect to the total number of mutations found in the 65 patients' DNA samples.

The analysis of 13,023 genes in 11 breast and 11 colorectal tumoral cell lines by Sjöblom *et al.* have shown that individual tumors accumulate an average of 90 mutated genes, indicating a rate of 6.2 mutations/Mb for colon cancer, most of them being single base substitutions (81%) [70]. To calculate the mutation rate, polymorphic sites were excluded, so there might have been an underestimation of the results. As noted in the article, while the rate of mutation is similar, the prevalence of different types of mutations that occur in both types of cancer differs, with the C:G to T:A transitions the most prevalent changes in the colon cancer and C:G to G:C transversions more rare, unlike breast cancer, where the percentages are different. These values are similar to those found in our study. As stated by the authors, the differences in the type of mutation were highly significant between the two types of tumors and have important implications for mutagenic mechanisms.

We can observe in TABLES 6–8 a clear difference between the rates of variation among the studied genes. There are cases where the total observed variation reaches 63% (*TYMS*) and others where it is as low as 9.2% (*ERCC1*). To see if this was true in other polymorphisms, we genotyped both tumor and blood samples for two more genes, one with a high heterozygosity (*GSTP1*) and another with low heterozygosity (*DPYD*). As can be observed in TABLE 7, *GSTP1* has a rate of variation between germline and tumor genotypes similar to the previous variation, but no differences were found for *DPYD*.

That is noteworthy because almost all individuals are G/G, and the change G:C to T:A is the most common, as we saw before.

Given that the C:G to T:A transitions are the most common mismatch changes in our tumors, it is clear that the chances of finding these alterations must be conditioned by the different genotypic frequencies of each gene in the sample. Thus, *XRCC1* and *ERCC1*, despite they having different rates of change (23.8 vs 9.2%), have very similar rates of change of C:G to T:A (15.4 vs 13.0%) and are, indeed, similar to other markers. However, for *DPYD*, for which almost all patients were G/G, the G:A change does not occur. Therefore, the C:G to T:A transitions are the most significant mutational changes in rectal tumors, but the exchange rate is not constant throughout the genome and varies widely according to the region of the genome considered.

Furthermore, these alterations may have consequences for association studies in pharmacogenetics. In our case, *TYMS* in tumoral samples is no longer significantly associated with TRG owing to the increase in the 3C allele, partly as a consequence of actual LOH but also as a consequence of more complex mutational changes. By contrast, *XRCC1* now appears to be significant owing to the increase of allele A, as a result of the transition C:G to T:A. The latter could not happen with the *ERCC1*, presumably because the allele involved is the C, and this is the least common allele. This loss will have little effect on the analysis of association, even if such association actually exists.

Intriguingly, tumors with the presence of *XRCC1* gene allele A, especially homozygotes, have a better response, in clear disagreement with expectations. Tumors carrying the A allele are presumed to have increased *XRCC1* expression resulting in activity rise and high DNA repair efficiency following exposure to DNA-damaging agents leading to bad response [71]. Thus, the result in the tumor does not confirm the assumption on which the pharmacogenetic utility of *XRCC1* could be built. However, the possibility remains that changes in the tumor can lead to a spurious association. We cannot confirm that hypothesis for most of the studied markers, and the results are also contradictory for *TYMS*. Moreover, the existence of hypermutability in a tumor, defined as the existence of three or more alterations in relation to germline tumor, is not associated with better or worse treatment response (exact test; $p = 0.55$).

These data highlight the difficulties of interpreting the results of pharmacogenetic markers. On one side, the tumors are the drug targets, and it seems logical that their analysis can improve response prediction. However, the interpretation of these data is complicated because the changes do not necessarily reflect adjustments to the cells, but the presence of 'jackpots', or DNA areas that are more likely to mutate.

Owing to the extension and particular pattern of somatic mutations in rectal cancer tumors, the study of pharmacogenetic markers, such as *XRCC1*, *ERCC1* or *ERCC2*, in blood samples and their associations with response to new drugs entering the neoadjuvant treatment arena, such as oxaliplatin, should be undertaken with some caution.

Although the detection of hypermutability in rectal cancer seems to question the results of the pharmacogenetic studies, it may, however, help to explain it. Our results for *XRCC1* in tumors, which support a significant association of genotype A/A with the response to treatment, could indicate that blood sample-based studies may be masking relevant tumor changes. In rectal cancer, compared with breast cancer, there is a difference in the frequency of the types of base substitutions and, in the case of *XRCC1*, this may help explain the association with treatment response.

At present, germline-based pharmacogenetics is useful for predicting toxicity but has serious limitations for the prediction of treatment response. As stated in this article, pharmacogenetic markers should be contrasted with the mutational pattern in each particular tumor type. The study of the tumor and, more specifically, the determination of the tumoral mutational spectrum could possibly improve response prediction.

Acknowledgements

The authors appreciate access to CHUS Tumor Tissue Bank from Dr Jerónimo Forteza.

Financial & competing interest disclosure

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Fondo de Investigación Sanitaria; Instituto de Salud Carlos III, PI061712), from Fundación Ramón Areces and from Fundación Barrie de la Maza (Programa DLANA). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

Somatic mutations & pharmacogenetics in chemoradiation for rectal cancer

- Although the volume of the literature on pharmacogenetic markers involved in the response to 5-fluorouracil (5-FU) is quite large, there are still few studies examining the relation between pharmacogenetic markers and response to chemoradiotherapy, and the clinical utility of these biomarkers remains controversial.
- This study examines whether the analysis of the differences in pharmacogenetic markers between tumor samples and peripheral blood can improve the prediction of the development of rectal cancer patients undergoing chemoradiotherapy.

Response to chemoradiation therapy & pharmacogenetic biomarkers variants

- A total of 11 polymorphisms in eight genes (*TYMS*, *MTHFR*, *XRCC1*, *ERCC1*, *ERCC2*, *EGFR*, *DPYD* and *GSTP1*) were genotyped by SNaPshot® sequencing or fluorescent fragment assays in a sample of 65 stage I/III rectal patients. The analysis was performed on genomic DNA extracted from paired peripheral blood samples and rectal cancer tumors.
- Significant association between good response rate and *TYMS* was found in the germline DNA sample (odds ratio [OR]: 2.19; 95% CI: 1.09–4.40; $p = 0.018$). No significant association was observed with the *XRCC1*, *ERCC2*, *MTHFR* and *EGFR* genes.

Somatic mutations & hypermutability in rectal cancer

- When the tumor samples were analyzed, a significant association with *XRCC1* ($p = 0.006$) was observed (odds ratio: 7.93; 95% CI: 1.03–60.83).
- Many differences between the genotype determined in blood and tumor samples were found, mainly somatic mutations; no microsatellite instability was detected and the number of events of loss of heterozygosity was low. Most tumors (72%) had two or more changes in genotype. The rate of changes varied between polymorphisms (mean: 22.3%; *TYMS* being the most variable marker, 62.9% of the samples) and the least variable ones (*ERCC1*: 9.2%, and *DPYD*: 0%).
- Somatic mutations in rectal tumors seem to occur via a stereotypical process linked to tumor specific mutagenic mechanisms. While we found no significant association between the hypermutation and response rate, these alterations may have consequences for association studies in pharmacogenetics.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
- of considerable interest

- Smith DE, Muff NS, Shetabi H: Combined preoperative neoadjuvant radiotherapy and chemotherapy for anal and rectal cancer. *Am. J. Surg.* 151, 577–580 (1986).
- Chen ET, Mohiuddin M, Brodovsky H, Fishbein G, Marks G: Downstaging of advanced rectal cancer following combined preoperative chemotherapy and high dose radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 30, 169–175 (1994).
- Sauer R, Becker H, Hohenberger W *et al.*: Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 351, 1731–1740 (2004).
- Wheeler JM, Dodds E, Warren BF *et al.*: Preoperative chemoradiotherapy and total mesorectal excision surgery for locally advanced rectal cancer: correlation with rectal cancer regression grade. *Dis. Colon Rectum* 47, 2025–2031 (2004).
- Carlomagno C, Farella A, Bucci L *et al.*: Neo-adjuvant treatment of rectal cancer with capecitabine and oxaliplatin in combination with radiotherapy: a Phase II study. *Ann. Oncol.* 20, 906–912 (2009).
- Ugidos L, Delgado S, Conill C *et al.*: Phase I trial of neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) with capecitabine and weekly irinotecan followed by laparoscopic total mesorectal excision (LTME) in rectal cancer patients. *Invest. New Drugs* 27, 262–268 (2009).
- Bertolini F, Chiara S, Bengala C *et al.*: Neoadjuvant treatment with single-agent cetuximab followed by 5-FU, cetuximab, and pelvic radiotherapy: a Phase II study in locally advanced rectal cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 73, 466–472 (2009).
- Willett CG, Duda DG, di Tomaso E *et al.*: Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: a multidisciplinary Phase II study. *J. Clin. Oncol.* 27, 3020–3026 (2009).
- Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS: 5-fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules* 13, 1551–1569 (2008).
- Gaughan DJ, Barbaux S, Kluijtmans LA, Whitehead AS: The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the *CLCN6* gene. *Gene* 257, 279–289 (2000).
- Ho DH, Townsend L, Luna M, Bodey GP: Distribution and inhibition of dihydrouracil dehydrogenase activities in human tissues using 5-fluorouracil as substrate. *Anticancer Res.* 6, 781–784 (1986).
- Johnson MR, Hageboutros A, Wang K, High L, Smith JB and Diasio RB: Life-threatening toxicity in a dihydropyrimidine dehydrogenase-deficient patient after treatment with topical 5-fluorouracil. *Clin. Cancer Res.* 5, 2006–2011 (1999).
- Pullarkat ST, Stoecklacher J, Ghaderi V *et al.*: Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* 1, 65–70 (2001).
- Cohen V, Panet-Raymond V, Sabbaghian N, Morin I, Batist G, Rozen R: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 9, 1611–1615 (2003).
- Johnson MR, Diasio RB: Importance of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients exhibiting toxicity following treatment with 5-fluorouracil. *Adv. Enzyme Regul.* 41, 151–157 (2001).
- Pawlik TM, Keyomarsi K: Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59, 928–942 (2004).
- Hoeijmakers JH: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366–374 (2001).
- Caldecott KW: *XRCC1* and DNA strand break repair. *DNA Repair* 2, 955–969 (2003).
- Valerie K, Povirk LF: Regulation and mechanisms of mammalian double strand break repair. *Oncogene* 22, 5792–5812 (2003).

- 20 Murray D, Rosenberg E: The importance of the ERCC1/ ERCC4[XPF] complex for hypoxic-cell radioresistance does not appear to derive from its participation in the nucleotide excision repair pathway. *Mutat. Res.* 364, 217–226 (1996).
- 21 Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M *et al.*: The structure-specific endonuclease ERCC1-XPF is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5776–5787 (2004).
- 22 Ahmad A, Robinson AR, Duensing A *et al.*: ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5082–5092 (2008).
- 23 Parshad R, Tarone RE, Price FM, Sanford KK: Cytogenetic evidence for differences in DNA incision activity in xeroderma pigmentosum group A, C and D cells after X-irradiation during G2 phase. *Mutat. Res.* 294, 149–155 (1993).
- 24 Satoh MS, Jones CJ, Wood RD, Lindahl T: DNA excision-repair defect of xeroderma pigmentosum prevents removal of a class of oxygen free radical-induced base lesions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 6335–6339 (1993).
- 25 Rzeszowska-Wolny J, Polanska J, Pietrowska M *et al.*: Influence of polymorphisms in DNA repair genes *XPD*, *XRCC1* and *MGMT* on DNA damage induced by γ radiation and its repair in lymphocytes *in vitro*. *Radiat. Res.* 164, 132–140 (2005).
- 26 Angelini S, Kumar R, Carbone F *et al.*: Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes. *Mutat. Res.* 570, 105–117 (2005).
- 27 Strimpakos AS, Syrigos KN, Saif MW: Pharmacogenetics and biomarkers in colorectal cancer. *Pharmacogenomics J.* 9, 147–160 (2009).
- 28 Huang RS, Ratain MJ: Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents. *CA Cancer J. Clin.* 59, 42–55 (2009).
- 29 Lamas MJ, Balboa E, Duran G *et al.*: Analysis of pharmacogenetic biomarkers in rectal patients treated with chemoradiotherapy. *J. Clin. Oncol. ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)* 27(15S), E15051 (2009).
- 30 Smith FM, Reynolds JV, Miller N, Stephens RB, Kennedy MJ: Pathological and molecular predictors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy. *Eur. J. Surg. Oncol.* 32, 55–64 (2006).
- 31 Debucquoy A, Goethals L, Geboes K, Roels S, McBride WH, Haustermans K: Molecular responses of rectal cancer to preoperative chemoradiation. *Radiother. Oncol.* 80, 172–177 (2006).
- 32 Kuremsky JG, Tepper JE, McLeod HL: Biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 74, 673–688 (2009).
- 33 Kikuchi M, Mikami T, Sato T *et al.*: High Ki67, Bax, and thymidylate synthase expression well correlates with response to chemoradiation therapy in locally advanced rectal cancers: proposal of a logistic model for prediction. *Br. J. Cancer* 101, 116–123 (2009).
- 34 Stochlmacher J, Goekkurt E, Mogk U *et al.*: Thymidylate synthase genotypes and tumour regression in stage II/III rectal cancer patients after neoadjuvant fluorouracil-based chemoradiation. *Cancer Lett.* 272, 221–225 (2008).
- 35 Yacoub A, McKinsty R, Hinman D, Chung T, Dent P, Hagan MP: Epidermal growth factor and IR up-regulate the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC1* in DU145 and LNCaP prostate carcinoma through MAPK signaling. *Radiat. Res.* 159, 439–452 (2003).
- 36 Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S: MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* 22, 5885–5596 (2003).
- 37 Lindblom, A: Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. *Curr. Opin. Oncol.* 13, 63–69 (2001).
- 38 Fernebro E, Halvarsson B, Baldetorp B, Nilbert M: Predominance of CIN versus MSI in the development of rectal cancer at young age. *BMC Cancer* 2, 25 (2002).
- 39 Gervaz P, Bucher P, Morel P: Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications. *J. Surg. Oncol.* 88, 261–266 (2004).
- 40 Li FY, Lai MD: Colorectal cancer, one entity or three. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 10, 219–229 (2009).
- 41 Slattery ML, Curtin K, Wolff RK *et al.*: A comparison of colon and rectal somatic DNA alterations. *Dis. Colon Rectum* 52, 1304–1311 (2009).
- 42 Kalady MF, Sanchez JA, Manilich E, Hammel J, Casey G, Church JM: Divergent oncogenic changes influence survival differences between colon and rectal adenocarcinomas. *Dis. Colon Rectum* 52, 1039–1045 (2009).
- 43 Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649 (1998).
- 44 Mandart AM, Dalibard F, Mandart JC *et al.*: Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer* 73(11), 2680–2686 (1994).
- 45 Zarate RN, Arias F, Bandres E, Cubedo E, Malumbres R, Garcia-Foncillas J: Xeroderma pigmentosum group D 751 polymorphism as a predictive factor in resected gastric cancer treated with chemo-radiotherapy. *World J. Gastroenterol.* 12, 6032 (2006).
- 46 Amador ML, Oppenheimer D, Perea S *et al.*: An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res.* 64, 9139–9143 (2004).
- 47 Contopoulos-Ioannidis DG, Alexiou GA, Gouvias TC, Ioannidis JP: An empirical evaluation of multifarious outcomes in pharmacogenetics: β -2 adrenoreceptor gene polymorphisms in asthma treatment. *Pharmacogenet. Genomics* 16, 705–711 (2006).
- Important study that highlights the fact that multifarious outcomes in pharmacogenetics literature are inconsistent across studies and susceptible to selective reporting.

48 Showalter SL, Showalter TN, Witkiewicz A *et al.*: Evaluating the drug-target relationship between thymidylate synthase expression and tumor response to 5-fluorouracil. Is it time to move forward? *Cancer Biol. Ther.* 7, 986–994 (2008).

•• Concludes that the connection between thymidylate synthase expression and patient response to 5-fluorouracil does not satisfy expectations for an effective drug–target relationship. Thus, the investigators question the reliability of thymidylate synthase expression as a clinical predictor of 5-fluorouracil response.
- 49 De Mattia E, Toffoli G: C677T and A1298C *MTHFR* polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. *Eur. J. Cancer* 45, 1333–1351 (2009).
- 50 Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA *et al.*: Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 19, 1779–1786 (2001).
- 51 Edler D, Glimelius B, Hallström M *et al.*: Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 20, 1721–1728 (2002).
- 52 Gusella M, Frigo AC, Bolzonella C *et al.*: Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 100, 1549–1557 (2009).

- 53 Morganti M, Ciantelli M, Giglioni B *et al.*: Relationships between promoter polymorphisms in the thymidylate synthase gene and mRNA levels in colorectal cancers. *Eur. J. Cancer* 41, 2176 (2005).
- 54 Ikediobi ON: Somatic pharmacogenomics in cancer. *Pharmacogenomics J.* 8, 305–314 (2008).
- 55 McWhinney SR, McLeod HL: Using germline genotype in cancer pharmacogenetic studies. *Pharmacogenomics* 10, 489–493 (2009).
- 56 Marsh S: Concordance between tumor and germline DNA. In: *Pharmacogenomics, Anticancer Drug Discovery, and Response*. Innocenti F (Ed.). Humana Press, NY, USA, 91–101 (2009).
- 57 Kawakami K, Ishida Y, Danenberg KD, Omura K, Watanabe G, Danenberg PV: Functional polymorphism of the thymidylate synthase gene in colorectal cancer accompanied by frequent loss of heterozygosity. *Jpn. J. Cancer Res.* 93, 1221–1229 (2002).
- 58 Uchida K, Hayashi K, Kawakami K *et al.*: Loss of heterozygosity at the thymidylate synthase (*TS*) locus on chromosome 18 affects tumor response and survival in individuals heterozygous for a 28-bp polymorphism in the *TS* gene. *Clin. Cancer Res.* 10, 433–439 (2004).
- **Important study demonstrating that response to 5-fluorouracil-based therapy is determined by tumor genotype.**
- 59 Jensen SA, Vainer B, Witton CJ, Jørgensen JT, Sørensen JB: Prognostic significance of numeric aberrations of genes for thymidylate synthase, thymidine phosphorylase and dihydrofolate reductase in colorectal cancer. *Acta Oncol.* 47, 1054–1061 (2008).
- **States that aberration of the *TYMS* gene is of significance to expression of thymidylate synthase, which may influence the biology and 5-fluorouracil sensitivity of colorectal cancer.**
- 60 Ooyama A, Okayama Y, Takechi T, Sugimoto Y, Oka T, Fukushima M: Genome-wide screening of loci associated with drug resistance to 5-fluorouracil-based drugs. *Cancer Sci.* 98, 577–583 (2007).
- **Results suggest that amplification of the *TYMS* gene is associated with innate resistance, supporting the possibility that *TYMS* copy number might be a predictive marker of drug sensitivity to fluoropyrimidines.**
- 61 Brody JR, Hucl T, Gallmeier E, Winter JM, Kern SE, Murphy KM: Genomic copy number changes affecting the thymidylate synthase (*TYMS*) gene in cancer: a model for patient classification to aid fluoropyrimidine therapy. *Cancer Res.* 66, 9369–9373 (2006).
- 62 Watson RG, Muhale F, Thorne L *et al.*: Association of copy number variants in colorectal liver metastases with 5-fluorouracil resistance. *Annu. J. Clin. Oncol.* 27, (2009) (Abstract E14502).
- 63 Lips EH, van Eijk R, de Graaf EJ *et al.*: Progression and tumor heterogeneity analysis in early rectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 772–781 (2008).
- **Important study investigating the numerous changes of the tumor in the early stages of rectal cancer.**
- 64 Losi L, Baisse B, Bouzourene H, Benhattar J: Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis* 26, 916–922 (2005).
- 65 Baisse B, Bouzourene H, Saraga EP, Bosman FT, Benhattar J: Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* 93, 346–352 (2001).
- 66 West CM, Elliott RM, Burnet NG: The genomics revolution and radiotherapy. *Clin. Oncol.* 19, 470–480 (2007).
- 67 Kim WC, Hong YC, Choi SK *et al.*: Relationship between *XRCC1* polymorphism and acute complication of chemoradiation therapy in the patients with colorectal cancer. *J. Korean Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 24, 30–36 (2006).
- 68 Zhang W, Park DJ, Lu B *et al.*: Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. *Clin. Cancer Res.* 15, 600–605 (2005).
- 69 Grade M, Becker H, Ried T *et al.*: Molecular cytogenetics: genomic imbalances in colorectal cancer and their clinical impact. *Cell. Oncol.* 28, 71–84 (2006).
- **Important review of the numerous chromosomal aberrations and changes produced in tumors.**
- 70 Sjöblom T, Jones S, Wood LD *et al.*: The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314, 268–274 (2006).
- **Important study that describes somatic mutations in several tumors.**
- 71 Cheng XD, Lu WG, Ye F, Wan XY, Xie X: The association of *XRCC1* gene single nucleotide polymorphisms with response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced cervical carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 28, 91 (2009).
- 72 van Kuilenburg AB, Meisma R, Zoetekouw L, Van Gennip AH: High prevalence of the *IVS14 + 1G>A* mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene of patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity. *Pharmacogenetics* 12(7), 555–558 (2002).
- 73 van Kuilenburg AB: Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur. J. Cancer* 40(7), 939–950 (2004).
- 74 Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K: Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct. Funct.* 20(3), 191–197 (1995).
- 75 Kawakami K, Salonga D, Park JM *et al.*: Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin. Cancer Res.* 7(12), 4096–4101 (2001).
- 76 Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE *et al.*: The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 12(12), 2640–2647 (1994).
- 77 Mandala MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S *et al.*: A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res.* 63(11), 2898–2904 (2003).
- 78 Kawakami K, Watanabe G: Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res.* 63(18), 6004–6007 (2003).
- 79 Mandala MV, Stoehlmacher J, Zhang W *et al.*: A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics* 14(5), 319–327 (2004).
- 80 Dotor E, Cuatrecasas M, Martínez-Iniesta M *et al.*: Tumor thymidylate synthase 1494del6 genotype as a prognostic factor in colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment. *J. Clin. Oncol.* 24(10), 1603–1611 (2006).
- 81 Frosst P, Blom HJ, Milos R *et al.*: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.* 10(1), 111–113 (1995).
- 82 Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R: A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) associated with decreased enzyme activity. *Mol. Genet. Metab.* 64(3), 169–172 (1998).

- 83 Sohn KJ, Croxford R, Yates Z, Lucock M, Kim YI: Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *J. Natl Cancer Inst.* 96(2), 134–144 (2004).
- 84 Etienne MC, Ilc K, Formento JL *et al.*: Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: relationships with 5-fluorouracil sensitivity. *Br. J. Cancer* 90(2), 526–534 (2004).
- 85 Evans E, Moggs JG, Hwang JR, Egly JM, Wood RD: Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J.* 16(21), 6559–6573 (1997).
- 86 Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Mohrenweiser HW, Golden A, Case LD: Amino acid substitution variants of *APE1* and *XRCC1* genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis* 22(6), 917–922 (2001).
- 87 Stoecklacher J, Ghaderi V, Iobal S *et al.*: A polymorphism of the *XRCC1* gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res.* 21(4B), 3075–3079 (2001).
- 88 Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R *et al.*: *XPB* polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 21(4), 551–555 (2000).
- 89 Stoecklacher J, Park DJ, Zhang W *et al.*: A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 91, 344–354 (2004).
- 90 Zárate RN, Arias F, Bandres E, Cubedo E, Malumbres R, García-Foncillas J: Xeroderma pigmentosum group D 751 polymorphism as a predictive factor in resected gastric cancer treated with chemo-radiotherapy. *World J. Gastroenterol.* 12(37), 6032–6036 (2006).
- 91 Park DJ, Stoecklacher J, Zhang W, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lenz HJ: A xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res.* 61(24), 8654–8658 (2001).
- 92 Gebhardt F, Zänker KS, Brandt B: Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J. Biol. Chem.* 274(19), 13176–13180 (1999).
- 93 Giralt JL, Aranzazu E, Manuel D *et al.*: Prognostic significance of epidermal growth factor receptor (EGFR) in patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: a GICOR study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Physics* 54, 98–99 (2002).
- 94 Graziano F, Ruzzo A, Loupakis F *et al.*: Pharmacogenetic profiling for cetuximab plus irinotecan therapy in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 26(9), 1427–1434 (2008).

CONCLUSIONES

CAPÍTULO VI:

CONCLUSIONES

- Es viable y factible la incorporación del análisis farmacogenético a la práctica clínica habitual del cáncer colorrectal. 266 pacientes aceptaron la propuesta. La toma de muestras no alteró la rutina prevista.
- La utilidad de los biomarcadores seleccionados es variable:
 - TS 5'UTR VNTR predice respuesta a quimiorradioterapia con 5FU o capecitabina en pacientes con cáncer de recto estadio II y III. Sin embargo no se comporta igual en los pacientes con enfermedad metastásica tratados con esquemas basados en 5 FU pero que incorporan otros fármacos. No podemos atribuir esta diferencia a ninguna de las dos variables probables: enfermedad avanzada versus enfermedad local, o esquemas farmacológicos complejos donde el peso de cada fármaco en el efecto final es desconocido, y por tanto la influencia de un polimorfismo determinado puede quedar enmascarado por el peso de otros. La delección de 6 pb en la región 3'UTR de este gen no se asocia a ningún efecto en la eficacia en ninguna de las situaciones estudiadas.
 - Ninguna de las dos variantes MTHFR (C677, A1298) se correlacionan con toxicidad o eficacia. Su función vendría dada de la influencia en la eficacia de las fluoropirimidinas como inhibidoras de la actividad timidilato sintetasa. El peso del polimorfismo TS 5' UTR VNTR podría solapar el papel de las variantes del MTHFR si lo tuviera.
 - Los polimorfismos en genes que codifican enzimas reparadores de ADN predicen la respuesta a quimiorradioterapia y a FOLFOX, aunque cada biomarcador con distinta influencia.

- ERCC1 118T y EGFR (TA)n no se relacionan con ninguna intervención terapéutica empleada.
- XPD-751 se asocia a mayor “supervivencia libre de progresión” en los pacientes tratados con oxaliplatino en esquema FOLFOX en la enfermedad avanzada. Asimismo, parece observarse un papel predictivo favorable en tasa de respuestas y “supervivencia global”, pero no alcanza significación estadística.
- XRCC1 predice respuesta a quimiorradioterapia en cáncer de recto. Los portadores de XRCC1 G/G (Arg/Arg) en línea germinal tienen la mayor probabilidad de conseguir un grado de regresión tumoral mayor (TRG1 o TRG2 de Mandard) y por ello, probablemente, de mayor probabilidad de supervivencia. La frecuencia de esta variante en la muestra tumoral es diferente, y su papel predictivo contradictorio: todas las muestras tumorales XRCC1 A/A respondieron al tratamiento, pero solo se trataba de 6.

La deficiencia en la actividad de los enzimas reparadores de ADN tienen un potencial papel pronóstico, de tal manera que la controversia entre nuestros resultados y los de otros investigadores al correlacionar variantes genéticas con actividad de radioterapia o agentes alquilantes, puede deberse a la interferencia del factor pronóstico negativo sobre el factor predictivo positivo.

- Los genes estudiados que están implicados en la depuración de los fármacos no predicen toxicidad.
 - La variante GSTP1 Ile105Val no predice mayor neurotoxicidad en pacientes tratados con FOLFOX como podría esperarse de su teórico papel en la acumulación intracelular de oxaliplatino, pero sí mejor tasa de respuestas a este tratamiento y mejor “supervivencia global”.

- DPYD*2A no predice toxicidad aguda de 5FU en ninguno de los grupos de pacientes tratados con el fármaco en monoterapia o formando parte de otras combinaciones.
- UGT1A1*28 no predice neutropenia ni diarrea grave por irinotecan cuando se administra a 180 mg/m² cada 2 semanas como corresponde al esquema FOLFIRI y bajo condiciones de práctica clínica real. El uso de factores estimulantes de colonias, la reducción de dosis en función del *“Performance Status”*, el retraso en las administraciones hasta la recuperación del recuento hematológico, las instrucciones al paciente individualizadas y por escrito del tratamiento precoz de la diarrea, pueden minimizar el riesgo tóxico que supone este polimorfismo. Por tanto, tal y como se recoge en los documentos del EGAPP y Pharmacogenetic Workshop de EMA, no consideramos recomendable su uso rutinario en la práctica clínica.
- La determinación de los polimorfismos en la muestra del tumor de recto no mejora la información con respecto a la obtenida en el análisis de ADN de leucocitos. El 72% de las muestras tienen más de 2 diferencias. Esto revela una situación de hipermutabilidad que podría condicionar la aplicación de los hallazgos obtenidos en línea germinal, aunque la existencia de hipermutabilidad entendida como más de 3 alteraciones no se asocia a mejor o peor respuesta al tratamiento.
 - El polimorfismo más variable es TS 5' UTR VNTR: de 24 pacientes con alelos asociados a alta expresión en sangre se pasa a 12 en tumor. La variación más frecuente es por pérdida de heterocigosidad en concreto para TS por ganancia alélicas de 3C.
 - Por otra parte, también ha cambiado el patrón de XRCC1, y la ganancia de alelos A lleva a relacionar esta variante, A/A, con respuesta, lo que no ocurría en sangre.

- Estos hallazgos abren una línea de continuación a este estudio, mediante el análisis de la implicación de la hipermutabilidad en la respuesta a los tratamientos antitumorales.

ANEXO

INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

NOMBRE DEL ESTUDIO:

PROYECTO FARMACOGENÉTICO PILOTO EN EL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA EN EL CÁNCER COLORRECTAL

1. Objetivo

Este documento tiene por objeto pedirle su consentimiento para ser incluido en un estudio encaminado a analizar algunas alteraciones genéticas que pueden estar en relación con la aparición de ciertos efectos secundarios a la quimioterapia en pacientes con cáncer colorrectal.

Existe una gran heterogeneidad en la respuesta individual a la quimioterapia, no sólo en términos de eficacia sino también de toxicidad, pudiendo esta última llegar a comprometer la vida del paciente. El objetivo de los estudios farmacogenéticos es identificar las bases hereditarias de las diferencias en la respuesta interindividual a fármacos, con el fin último de seleccionar el tratamiento óptimo en función del perfil genético de cada paciente.

El único procedimiento que se le realizará además del establecido de forma estándar será la extracción de 1 muestra de sangre de 5 mililitros, como la que se realiza en un análisis de sangre rutinario. El ADN obtenido será almacenado y conservado a bajas temperaturas, en un lugar seguro y de acceso restringido durante el cual podrá ser analizado para valorar la presencia de alteraciones genéticas que afecten a la respuesta a los medicamentos usados en el tratamiento del cáncer colorrectal y sólo para ese fin.

2. Descripción de los procedimientos del estudio

Para este estudio se le extraerá una muestra de sangre para analizar posibles cambios genéticos que influyan en la respuesta a fármacos.

3. Beneficios

Usted no obtendrá ningún beneficio inmediato de la participación en este estudio. Sin embargo, la información obtenida en este estudio puede permitir conocer las asociaciones existentes entre alteraciones genéticas y respuesta a quimioterapia incluyendo posibles efectos secundarios. Los datos obtenidos nos permitirán desarrollar estrategias de prevención de efectos secundarios y optimizar la respuesta a tratamientos quimioterápicos.

4. Riesgos

Su participación en este estudio no supondrá ningún riesgo adicional, puesto que no implica ningún cambio en las medidas de diagnóstico y tratamiento que se le van a aplicar.

5. Participación voluntaria

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Usted es libre de retirarse del estudio en cualquier momento si así lo cree conveniente, sin tener que especificar los motivos, y sin que su decisión perjudique en el futuro la atención médica que merece.

6. Confidencialidad

Toda la información resultante de su participación en el Estudio será almacenada y se tratará de forma confidencial según se recoge en la Ley Orgánica 15/99 de protección de datos de carácter personal. Los resultados del Estudio pueden ser publicados en revistas médicas. Sin embargo, su nombre no aparecerá en ningún documento. **Este Estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia.**

7. Información

El Responsable del Estudio en este Centro, María Jesús Lamas, es facultativo de plantilla de este Hospital y le dará toda la información complementaria del estudio que Usted desee. Usted puede contactar con este facultativo llamando al teléfono 981 951470

Las muestras obtenidas se almacenarán en este Hospital y no serán utilizadas para ninguna finalidad empresarial o que pueda implicar la obtención de beneficios económicos.

Tampoco se utilizarán para otros análisis genéticos que no sean la respuesta a fármacos en el tratamiento de su enfermedad de colon.

Si Usted tiene alguna duda o pregunta con respecto al carácter de este Estudio, no dude en contactar con la(s) persona(s) que lo llevan a cabo. También puede Usted contactar con el presidente del comité de investigación en:

Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia

Edificio Administrativo San Lázaro, s/n

15703 Santiago de Compostela

Teléfono: (981) 546425

Fax: (981) 541804

e-mail: ceic@sergas.es

8. ¿Qué otras opciones tiene Usted?

Usted puede decidir no participar en este estudio.

Facultativo que participa en la obtención del consentimiento:

.....

CONSENTIMIENTO INFORMADO

**NOMBRE DEL ESTUDIO: PROYECTO FARMACOGENÉTICO PILOTO EN EL TRATAMIENTO CON
QUIMIOTERAPIA EN EL CÁNCER COLORRECTAL**

Código del Estudio: **PROTOCOLO COLON**

Yo,

(nombre y apellidos en mayúsculas)

.....

- He leído la hoja de información que se me ha entregado

- He podido hacer preguntas sobre el Estudio

- He recibido suficiente información sobre el Estudio

- He hablado con:

(nombre del investigador en mayúsculas)

.....

Comprendo que:

1. Mi participación es voluntaria

2. Que no me supone ningún beneficio directo

3. Que la no aceptación de participar en este estudio no repercutirá en mis cuidados

médicos

4. Que la información obtenida de este estudio es confidencial

Doy mi autorización para que se utilice para este estudio:

__ mi historia clínica

__ muestra sanguínea

Fecha) (Firma del participante)

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- ¹ International Agency for Research on Cancer (IARC), en <http://www.iarc.fr/>, ultimo acceso 15-sept-2010
- ² Karlen P, Lofberg R, Brostrom O, Leijonmarck CE, Hellers G, Persson PG. Increased risk of cancer in ulcerative colitis: a population based cohort study. *Am J Gastroenterology* 1999; 94: 1047-52.
- ³ Moum B, Ekblom A, Vatn MH, Elgjo K. Change in the extent of colonoscopic and histological involvement in ulcerative colitis over time. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1564-1569.
- ⁴ Mulcahy MF, Benson AB. Posttreatment surveillance of colon and rectal cancers. En: American Society of Clinical Oncology Educational Book. New York: ASCO publishers; 2002. p. 646-50
- ⁵ Rex DK, Lehman GA, Ulbright TM, et al. Colonic neoplasia in asymptomatic persons with negative fecal occult blood tests: influence of age, gender, and family history. *Am J Gastroenterol* 1993;88:825-831
- ⁶ Winawer S.J, Zaubler A. G., Ho M, et al, and the National Polyp Study Workgroup. Prevention of Colorectal Cancer by Colonoscopic Polypectomy. *N Engl J Med* 1993; 329:1977-1981.
- ⁷ Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, et al. Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology*. Nov 1987;93(5):1009-13
- ⁸ Leslie A, Carey FA, Pratt NR et al. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* 2002;89:845-860.
- ⁹ Järvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H et al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2000 May;118(5):829-34.
- ¹⁰ Tinat J, Baert-Desurmont S, Latouche JB, et al. The three nucleotide deletion within the 3'untranslated region of MLH1 resulting in gene expression reduction is not a causal alteration in Lynch syndrome. *Fam Cancer*. 2008;7(4):339-40.
- ¹¹ Shatari T, Fujita M, Nozawa K, et al. Vascular anatomy for right colon lymphadenectomy. *Surg Radiol Anat* 2003;25:86.
- ¹² Garcia-Ruiz A, Milsom JW, Ludwig KA, Marchesa P. Right colonic arterial anatomy. Implications for laparoscopic surgery. *Dis Colon Rectum* 1996;39:906.
- ¹³ Dukes CE. The surgical pathology of rectal cancer. *J Clin Pathol*. 1949;2:95-8.

-
- ¹⁴ Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann. Surg.* 1954;139(6):846-52
 - ¹⁵ American Joint Committee on Cancer. *Colon and rectum*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2002:113.
 - ¹⁶ Pickhardt PJ, Choi JR, Hwang I, et al. Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults. *N Engl J Med* 2003;349:2191.
 - ¹⁷ Shami VM, Parmar KS, and Waxman I. Clinical impact of endoscopic ultrasound and endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration in the management of rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2004;47:59-65.
 - ¹⁸ Johnson CD, Ahlquist DA. Computed tomography colonography (virtual colonoscopy): a new method for colorectal screening. *Gut* 1999;44:301.
 - ¹⁹ Rocklin MS, Senagore AJ, Talbott TM. Role of carcinoembryonic antigen and liver function tests in the detection of recurrent colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1991;34:794.
 - ²⁰ Canter RJ, Williams NN. Surgical treatment of colon and rectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002;16:907.
 - ²¹ Shatari T, Fujita M, Nozawa K, et al. Vascular anatomy for right colon lymphadenectomy. *Surg Radiol Anat* 2003;25:86.
 - ²² Colquhoun PH, Wexner SD. Surgical management of colon cancer. *Curr Gastroenterol Rep* 2002;4:414.
 - ²³ Stotland BR, Siegelman ES, Morris JB, Kochman ML. Preoperative and postoperative imaging for colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1997;11:635.
 - ²⁴ Libutti SK, Forde KA. Surgical considerations III: bowel anastomosis. In: Cohen A, Weaver S, eds. *Cancer of the colon, rectum and anus*. New York: McGraw-Hill, 1995:445.
 - ²⁵ Koh DM, Brown G, Temple L et al. Rectal cancer: mesorectal lymph nodes at MR imaging with USPIO versus histopathologic findings--initial observations. *Radiology* 2004;231:91-99.
 - ²⁶ Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenburg EK et al. Circumferential margin involvement is still an important predictor of local recurrence in rectal carcinoma: not one millimeter but two millimeters is the limit. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:350-357.
 - ²⁷ Nagtegaal ID, van de Velde CJ, Marijnen CA et al. Low rectal cancer: a call for a change of approach in abdominoperineal resection. *J Clin Oncol* 2005; 23:9257-9264.

-
- ²⁸ Wibe A, Syse A, Andersen E et al. Oncological outcomes after total mesorectal excision for cure for cancer of the lower rectum: anterior vs. abdominoperineal resection. *Dis Colon Rectum* 2004; 47:48-58.
- ²⁹ Nagtegaal ID, van de Velde CJ, Marijnen CA et al. Low rectal cancer: a call for a change of approach in abdominoperineal resection. *J Clin Oncol* 2005; 23:9257-9264.
- ³⁰ Compton CC and Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin* 2004; 54:295-308.
- ³¹ Dworak O, Keilholz L, and Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 1997; 12:19-23.
- ³² Vecchio FM, Valentini V, Minsky BD et al. The relationship of pathologic tumor regression grade (TRG) and outcomes after preoperative therapy in rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62:752-760.
- ³³ Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al: Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J Clin Oncol* 13:2936-2943, 1995
- ³⁴ Moertel CG; Fleming TR; Macdonald JS et al. Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J Clin Oncol* 1995 Dec;13(12):2936-43.
- ³⁵ Taal BG; Van Tinteren H; Zoetmulder FA,et al. Adjuvant 5FU plus levamisole in colonic or rectal cancer: improved survival in stage II and III. *Br J Cancer* 2001 Nov 16;85(10):1437-43.
- ³⁶ Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet* 1995 Apr 15;345(8955):939-44.
- ³⁷ Quasar Collaborative Group; Gray R; Barnwell J; McConkey C et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*. 2007 Dec 15;370(9604):2020-9.
- ³⁸ Figueredo A; Charette ML; Maroun J; Brouwers MC; Zuraw L. Adjuvant therapy for stage II colon cancer: a systematic review from the Cancer Care Ontario Program in evidence-based care's gastrointestinal cancer disease site group. *Clin Oncol* 2004 Aug 15;22(16):3395-407.
- ³⁹ Daniel J. Sargent, Silvia Marsoni, Genevieve Monges,et al. Defective Mismatch Repair As a Predictive Marker for Lack of Efficacy of Fluorouracil-Based Adjuvant Therapy in Colon Cancer. *J. Clin. Oncology*, July 10, 2010 vol. 28 no. 20 3219-3226.
- ⁴⁰ Choti MA, Sitzmann JV, Tiburi MF,et al. Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg*. 2002 Jun;235(6):759-66.

-
- ⁴¹ Adam R, Delvart V, Pascal G, et al. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg*. 2004 Oct;240(4):644-57.
- ⁴² Scheithauer W, Rosen H, Kornek GV, Sebesta C, Depisch D. Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. *BMJ*. 1993 Mar 20;306(6880):752-5.
- ⁴³ Palliative chemotherapy for advanced or metastatic colorectal cancer. Colorectal Meta-analysis Collaboration. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD001545.
- ⁴⁴ Saltz LB, Cox JV, Blanke C, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med*. 2000 Sep 28;343(13):905-14.
- ⁴⁵ Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, et al: A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22:23-30, 2004
- ⁴⁶ Tournigand C, Louvet C, Quinax E, et al: Folinic acid, fluorouracil, and irinotecan followed by folinic acid, fluorouracil, and oxaliplatin or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 22: 10.1200/JCO.2004.05.113
- ⁴⁷ Alfredo Falcone, Sergio Ricci, Isa Brunetti, et al. Phase III Trial of Infusional Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin, and Irinotecan (FOLFOXIRI) Compared With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan (FOLFIRI) As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: The Gruppo Oncologico Nord Ovest. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 25, No 13 (May 1), 2007: pp. 1670-1676
- ⁴⁸ Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21:60-5.
- ⁴⁹ Hochster H, Hart L, Ramanathan R, Hainsworth J, Hedrick E, Childs B. Safety and efficacy of oxaliplatin/fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): final analysis of the TREE-Study. *J Clin Oncol*. 2006; 24[abstract 3510].
- ⁵⁰ Grothey A, Sugrue M, Hedrick E, et al. Association between exposure to bevacizumab (BV) beyond first progression (BBP) and overall survival (OS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer(mCRC): results from a large observational study (BRITE). *J Clin Oncol*. 2007; 25:4036.
- ⁵¹ Okines A, Puerto OD, Cunningham D, et al. Surgery with curative-intent in patients treated with first-line chemotherapy plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer First BEAT and the randomised phase-III NO16966 trial. *Br J Cancer*. 2009 Oct 6;101(7):1033-8.

-
- ⁵² Christos S. Karapetis, M.D., Shirin Khambata-Ford, Ph.D., Derek J. Jonker *K-ras* Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2008;359:1757-1765
- ⁵³ Eric Van Cutsem, Claus-Henning Köhne, Erika Hitre, et al. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2009; 360:1408-1417 April 2, 2009
- ⁵⁴ K. Bujko K., Glynne-Jones R. and Bujko M. Does adjuvant fluoropyrimidine-based chemotherapy provide a benefit for patients with resected rectal cancer who have already received neoadjuvant radiochemotherapy? A systematic review of randomised trials *Annals of Oncology* 21: 1743–1750, 2010
- ⁵⁵ Colorectal Cancer Collaborative Group. Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8,507 patients from 22 randomised trials. *Lancet*. 2001 Oct 20;358(9290):1291-304.
- ⁵⁶ Cionini L, Manfredi B, Sainato A et al: Randomized study of postoperative chemotherapy after preoperative chemoradiation in locally advanced rectal cancer. Preliminary results. Proceedings of the 11st European Cancer Conference. *Eu J Cancer* 2001; 37 (S 6): 300s
- ⁵⁷ Jean-Pierre Gérard, Thierry Conroy, Franck Bonnetain, et al. Preoperative Radiotherapy With or Without Concurrent Fluorouracil and Leucovorin in T3-4 Rectal Cancers: Results of FFCD 9203. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 24, No 28 (October 1), 2006: pp. 4620-4625
- ⁵⁸ Ceelen WP, Van Nieuwenhove Y, Fierens K. Preoperative chemoradiation versus radiation alone for stage II and III resectable rectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Jan 21;(1):CD006041.
- ⁵⁹ Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 21;351(17):1731-40.
- ⁶⁰ Quah HM, Chou JF, Gonen M, et al. Pathologic stage is most prognostic of disease-free survival in locally advanced rectal cancer patients after preoperative chemoradiation. *Cancer*. 2008 Jul 1;113(1):57-64.
- ⁶¹ Roh, M. S., et al. "Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03." *J.Clin.Oncol*. 27.31 (2009): 5124-30.
- ⁶² Minsky, Bruce D. "Is Preoperative Chemoradiotherapy Still the Treatment of Choice for Rectal Cancer?" *J Clin Oncol* 27.31 (2009): 5115-16.

-
- ⁶³ Jean-Pierre Gérard, David Azria, Sophie Gourgou-Bourgade, et al. Comparison of Two Neoadjuvant Chemoradiotherapy Regimens for Locally Advanced Rectal Cancer: Results of the Phase III Trial ACCORD 12/0405-Prodige 2. *J Clin Oncol* April 1, 2010 vol. 28 no. 10 1638-1644.
- ⁶⁴ C. Aschele, C. Pinto, S. Cordio, et al. Preoperative fluorouracil (FU)-based chemoradiation with and without weekly oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: Pathologic response analysis of the Studio Terapia Adiuvante Retto (STAR)-01 randomized phase III trial. *J Clin Oncology*, 2009 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 27, No 18S (June 20 Supplement), 2009: CRA4008
- ⁶⁵ By J.E. Tepper, M. O'Connell, D. Niedzwiecki, et al. Adjuvant Therapy in Rectal Cancer: Analysis of Stage, Sex, and Local Control—Final Report of Intergroup 0114. *J Clin Oncology* April 1, 2002 vol. 20 no. 7 1744-1750
- ⁶⁶ Minsky BD, Guillem JG. Multidisciplinary management of resectable rectal cancer. New developments and controversies. *Oncology (Williston Park)*. 2008 Nov 15;22(12):1430-7.
- ⁶⁷ R. Hofheinz, F. Wenz, S. Post, et al. Capecitabine (Cape) versus 5-fluorouracil (5-FU)-based (neo-)adjuvant chemoradiotherapy (CRT) for locally advanced rectal cancer (LARC): Safety results of a randomized, phase III trial. *J Clin Oncology* Vol 27, No 15S (May 20 Supplement), 2009: 4014.
- ⁶⁸ Ikediobi ON. Somatic pharmacogenomics in cancer *The Pharmacogenomics Journal* (2008) 8, 305–314
- ⁶⁹ Esteller M., Garcia-Foncillas J., Andion E., et al. Inactivation of the DNA-Repair Gene *MGMT* and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents. *N Engl J Med* 2000; 343:1350 - 1354
- ⁷⁰ Legi M.E., Diserens A.-C., Gorlia T, et al. *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352:997 – 1003.
- ⁷¹ Wang K, Li M, Bucan M. Pathway-based approaches for analysis of genomewide association studies. *Am J Hum Genet*. 2007;81:1278–83.
- ⁷² Nguyen H, Tran A, Lipkin S, and Fruehauf P. Pharmacogenomics of Colorectal Cancer Prevention and Treatment. *Cancer Investigation* 2006; 24:630-639
- ⁷³ Danenberg PV. Thymidilate synthetase- a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta*. 1977 Dec 23; 473(2):73-92.

-
- ⁷⁴ Falcone A, Pfanner E, Brunetti I, Allegrini G, Lencioni M, Galli C, Masi G, Danesi R, Antonuzzo A, Del Tacca M, Conte PF. Suramin in combination with 5-fluorouracil (5-FU) and leucovorin (LV) in metastatic colorectal cancer patients resistant to 5-FU+LV-based chemotherapy. *Tumori* 1998; 84:666-668.
- ⁷⁵ Otake Y, Tanakara F, Yanagihara K, Hitomi S, Okabe H, Fukushima M, Wada H. Expression of Thymidylate Synthase in Human Non-small Cell Lung Cancer. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90:1248-53.
- ⁷⁶ Danenberg PV. Thymidylate synthetase- a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta*. 1977 Dec 23;473(2):73-92.
- ⁷⁷ Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K: Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995, 20: 191-97
- ⁷⁸ Marcuello E, Altes A, del Rio E, Cesar A, Menoyo A, and Baiget M. Single nucleotide polymorphism in the 5'-tandem repeat sequences of Thymidylate Synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer*, 2004. 112: 733-737
- ⁷⁹ Lecomte T, Ferraz JM, Zinzindohoue F, Lorient MA, Tregouet DA, Landi B, Berger A. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-Fluorouracil-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res*. 2004 Sept 1; 10(17): 5880-8
- ⁸⁰ Mandola MV, Stoecklacher J, et al. A 6pb polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics*. 2004. May; 14(5):319-327
- ⁸¹ Van Kuilenburg AB, Meinsma R, Beke E, Bobba B, Boffi P et al. Identification of three novel mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene associated with altered pre mRNA splicing or protein function. *Biol. Chem* 2005; 286:319-329.
- ⁸² Johnson MR, Wang K, Tillmanns S, Albin N, Diasio RB. Structural organization of human DPD gene. *Cancer Res.*, 1997. 57: 1660-1663
- ⁸³ Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Clin Epidemiol* 2004;159:423-43.
- ⁸⁴ Narayanan S, McConnell J, Little J, Sharp L, Piyathilake CJ, Powers H, Basten G, and Duthie SJ. Associations between two common variants C677T and A1298C in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(9): 1436-43).

-
- ⁸⁵ Cohen V, Panet-Raymond V, Sabbaghian N, Morin I, Batist G, Rozen R. Methylene tetrahydrofolate Reductase Polymorphism in Advanced Colorectal Cancer: A Novel Genomic Predictor of Clinical Response to Fluoropyrimidine-based Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, May 2003. Vol 9, 1611-15.
- ⁸⁶ Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin. Oncol* 1998 Apr 25(suppl.5):4-12.
- ⁸⁷ Woynarowski JM, Chapman WG, Napier C, Herzig MC, Juniewicz P. Sequence- and region specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. *Mol Pharmacol*. 1998 Nov;54(5):770-7.
- ⁸⁸ Kelland L. the resurgence of platinum-based cancer chemotherapy . *Nat Rev Cancer*. 2007 Aug;7(8):573-84.
- ⁸⁹ Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2007, 7, 3-18.
- ⁹⁰ Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistace. *Oncogene* (2003) 22, 7265-7279.
- ⁹¹ Watson MA, Stewart RK, Smith GB, MasseyTE, Bell DA. Human glutathione S transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 1998;19:275-80.
- ⁹² Goto S, Iida T, Cho S, Oka M, Kohno S, Kondo T. Overexpression of glutathione S-transferase pi enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells. *Free Radic Res* 1999;31:549–58.
- ⁹³ Lecomte Thierry, Landi Bruno, Beaune Philippe. Glutathione S-Transferase P1 Polymorphism (Ile¹⁰⁵Val) Predicts Cumulative Neuropathy in Patients Receiving Oxaliplatin-Based Chemotherapy. *Clin Cancer Res* May 15, 2006 12:3050-3056.
- ⁹⁴ Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, Bell DA. XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis*. 2000. 21:551-555.
- ⁹⁵ Park DJ, Stoehlmacher J, Zhang W, et al: ERCC1 polymorphism is associated with differential ERCC1 mRNA levels. *Proc Am Ass Cancer Res* 43:321, 2002 (abstr. 1591)
- ⁹⁶ Park DJ, Zhan g W, Stoehlmacher J, et al. ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* 2003;1:162–6.

-
- ⁹⁷ Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, Bell DA. XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis*. 2000. 21:551-555.
- ⁹⁸ Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, Bell DA. XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis*. 2000. 21:551-555.
- ⁹⁹ Demokan S, Demir D, Suoglu Y, Kiyak E, Akar U, Dalay N. Polymorphisms of the XRCC1 DNA Repair Gene in Head and Neck Cancer. *Pathology Oncology Res*. 2005. 11:22-25.
- ¹⁰⁰ Sai K, Saeki M, Saito Y, et al. UGT1A1 haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese patients with cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75:501-515
- ¹⁰¹ Iyer L, Das S, Janisch L, et al. UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J* 2002;2:43-47
- ¹⁰² Mathijssen RH, Marsh S, Karlsson MO, et al: Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics. *Clin Cancer Res* 9:3246-3253, 2003
- ¹⁰³ Paoluzzi L, Singh AS, Price DK, et al: Influence of genetic variants in UGT1A1 and UGT1A9 on the in vivo glucuronidation of SN-38. *J Clin Pharmacol* 44:854-860, 2004
- ¹⁰⁴ Stewart CF, Panetta JC, O'Shaughnessy MA, Throm SL, Fraga CH, Owens T, Liu T, Billups C, Rodriguez-Galindo C, Gajjar A, Furman WL, McGregor LM. UGT1A1 promoter genotype correlates with SN-38 pharmacokinetics but not severe toxicity in patients receiving low-dose irinotecan. *J Clin Oncol* 25:2594-2600, 2007.
- ¹⁰⁵ Palomaki, Glenn E.; Bradley, Linda A.; Douglas, Michael P.; Kolor, Katherine; Dotson, W David. Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? An evidence-based review. *Genetics in Medicine*. 11(1):21-34, January 2009.
- ¹⁰⁶ Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Del Rio E, Gomez-Pardo M, Baiget M. UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2004;91:678-682.
- ¹⁰⁷ Toffoli G, Cecchin E, Corona G, et al: The role of UGT1A1*28 polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 24:3061-3068, 2006
- ¹⁰⁸ Garsparini G., D'Andrea M.R., Toffoli G. Irinotecan in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer: Is the Story Finished or Does Personalized Therapy Open New Opportunities? *Journal of Clinical Oncology*, Vol 28, No 12 (April 20), 2010

-
- ¹⁰⁹ Hoskins J M, Goldberg R.M., Qu P., Ibrahim J.G., McLeod H. UGT1A1*28 Genotype and Irinotecan-Induced Neutropenia: Dose Matters JNCI J Natl Cancer Inst (2007) 99(17): 1290-1295
- ¹¹⁰ Côté JF, Kirzin S, Kramar et al. A UGT1A1 polymorphism can predict hematologic toxicity in patients treated with irinotecan. Clin Cancer Res. 2007 Jun 1;13(11):3269-75
- ¹¹¹ Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? Nat Rev Drug Discov 2007;6: 273-86.
- ¹¹² Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. Nat Rev Drug Discov 2004; 3:391-400.
- ¹¹³ Lee S, Chen TT, Barber CL, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. Cell 2007;130:691-703.
- ¹¹⁴ Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. J Clin Oncol 2003;21:2787-99.
- ¹¹⁵ Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW: Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Cell Res* 2003 , 284(1):31-53.
- ¹¹⁶ Mancuso A, Leone L, Vigna F et al.- EGFR, DCC and K-RAS mutations as predictive factors for cetuximab sensitivity in metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 26: (suppl; abstr 4128), 2008.
- ¹¹⁷ Tabernero J., Van Cutsem E., Díaz-Rubio E., et al. Phase II Trial of Cetuximab in Combination With Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in the First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. Journal of Clinical Oncology, Vol 25, No 33, 2007: (5225-5232)
- ¹¹⁸ Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. J Clin Oncol 2009;27: 2091-6.
- ¹¹⁹ Barault L, Veyrie N, Jooste V et al.- Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. In J Cancer 122: 2255-2259, 2008.
- ¹²⁰ Capuzzo F, Varela-Garcia M, Finocchiaro G et al.- Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients. Br J Cancer 99 (1): 83-9, 2008.
- ¹²¹ Tan YH, Liu Y, Eu KW et al.- Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing. Pathology 40: 295-298, 2008.

-
- ¹²² Calistri D, Rengucci C, Seymour I et al.- Mutation analysis of p53, K-ras and BRAF genes in colorectal cancer progression. *J Cell Physiol* 204: 484-488, 2005.
- ¹²³ Artake S, Sartore-Bianchi A, Veronese S et al.- Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 4217-4219, 2008.
- ¹²⁴ Jhawer M, Goel S, Wilson AJ et al.-PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res* 68 (6): 1953-61, 2008.
- ¹²⁵ Jhawer M, Goel S, Wilson AJ et al.- PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res* 68 (6): 1953-61, 2008.
- ¹²⁶ Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal J, Carnero A.- PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* 28 (7): 1379-1386, 2007.
- ¹²⁷ Bing-Hua J, Ling-Zhi L.- PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784: 150-158, 2008.
- ¹²⁸ Frattini M, Saletti P, Romagnani E et al.- PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 97 (8): 1139-45, 2007.
- ¹²⁹ Kim MS, Jeong EG, Yoo NJ, Lee SH.- Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukemias. *Br J Cancer* 98: 1553-5, 2008.
- ¹³⁰ Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F et al.- AKT1(E17K) in human solid tumors. *Oncogene* 26 (Epub ahead of print), 2008.
- ¹³¹ Gamelin E et al. Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, fluorouracil (5FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: a potential interest for predicting 5FU toxicity and determining optimal 5 FU dosage. *JCO*, 17, 1105-1112
- ¹³² Klein CE et al. Population pharmacokinetic model for irinotecan and two of its metabolites, SN-38 and SN-38 glucuronide. *Clin Pharmacol Ther.* 2002 Dec;72(6):638-47.
- ¹³³ Bastian G. Population pharmacokinetics of oxaliplatin in patients with metastatic cancer. *Anticancer Drugs.* 2003 Nov;14(10):817-24.
- ¹³⁴ <http://www.recist.com/> ultimo acceso 15 sept 2010

-
- ¹³⁵ Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer* 1994;73:2680-6.
- ¹³⁶ Cancer Therapy Evaluation Program, Common Terminology Criteria for Adverse Events, Version 3.0, DCTD, NCI, NIH, DHHS March 31, 2003 en <http://ctep.cancer.gov>, acceso último 15 sept 2010
- ¹³⁷ De Jong et al. Role of pharmacogenetics in irinotecan therapy. *Cancer Lett.* 2006 Mar 8;234(1):90-106
- ¹³⁸ Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Del Rio E, Gomez-Pardo M, Baiget M. UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2004 Aug 16;91(4):678-82.
- ¹³⁹ Wei X, Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *J Clin Invest.* 1996 Aug 1;98(3):610-5.
- ¹⁴⁰ Van Kuilenburg High prevalence of the IVS14+1G4A mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene of patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 555–558
- ¹⁴¹ Marcuello E et al. Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 2004 Dec 10;112(5):733-7.
- ¹⁴² Marsh S, McLeod HL Thymidylate synthase pharmacogenetics in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2001; 1, 175–178
- ¹⁴³ Mandola MV et al . A novel SNP within the tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and predicts outcome of metastatic colorectal carcinoma treated with 5-fluorouracil. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2003; 44: 597
- ¹⁴⁴ Ulrich CM, Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2000 Prev 9: 1381–1385
- ¹⁴⁵ McLeod HL, Pharmacogenetic analysis of systemic toxicity and response after 5-fluorouracil (5FU)/CPT-11, 5FU/oxaliplatin (oxal), or CPT-11/oxal therapy for advanced colorectal cancer. *Proc Am Assoc Clin Oncol* 2003; 22,252

-
- ¹⁴⁶ Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Rio ED, Baiget M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: genomic predictors of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy? *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005 Sep 27;:1-6
- ¹⁴⁷ Sohn KJ, et al. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Jan 21;96(2):134-44.
- ¹⁴⁸ Etienne MC, et al. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: relationships with 5-fluorouracil sensitivity. *Br J Cancer*. 2004 Jan 26;90(2):526-34.
- ¹⁴⁹ Kweekel DM et al. Pharmacology of oxaliplatin and the use of pharmacogenomics to individualize therapy. *Cancer Treat Rev*. 2005 Apr;31(2):90-105. Review.